

FOXO-abhängige Regulation von Immunabwehr und Lebensspanne in *Drosophila melanogaster*

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Gerrit Loch
aus
Bonn

Bonn 2012

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter

Prof. Dr. rer. nat. Michael Hoch

2. Gutachter

PD Dr. rer. nat. Reinhard Bauer

Tag der Promotion : 26.09.2012

Erscheinungsjahr : 2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Bonn, den 17.08.2012

Nachname: Loch Vorname: Gerrit

Unterschrift:

Erklärung

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Stumpfe, D., Bill, A., Novak, N., **Loch, G.**, Blockus, H., Geppert, H., Becker, T., Schmitz, A., Hoch, M., Kolanus, W., Famulok, M., Bajorath, J., 2010. Targeting multifunctional proteins by virtual screening: structurally diverse cytohesin inhibitors with differentiated biological functions. ACS Chem Biol 5, 839-849.

Becker, T., **Loch, G.**, Beyer, M., Zinke, I., Aschenbrenner, A.C., Carrera, P., Inhester, T., Schultze, J.L., Hoch, M., 2010. FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. Nature 463, 369-373.

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Der Insulinsignalweg.....	3
2.1.1	Der Insulinsignalweg in Drosophila.....	3
2.1.2	Der FOXO-Transkriptionsfaktor.....	5
2.1.3	Das Cytohesin Steppke.....	7
2.1.4	Secins - Inhibitoren des Cytohesins Steppke	8
2.2	Das angeborene Immunsystem	10
2.2.1	Das angeborene Immunsystem in Drosophila	10
2.2.2	Systemische und lokale Immunabwehr	10
2.2.3	Antimikrobielle Peptide	12
2.2.4	Antimikrobielle Peptide in Drosophila	13
2.3	Altern und Lebensspanne	15
2.3.1	Der Prozess des Alterns.....	15
2.3.2	Altern und Lebensspanne in Drosophila	16
2.3.3	Einfluss des Insulinsignalwegs und FOXO auf die Lebensspanne	18
2.3.4	Regulation von AMPs durch den Insulinsignalweg in der Larve	18
2.4	Zielsetzung.....	20
3	Materialien	21
3.1	Allgemeine Materialien.....	21
3.1.1	Geräte	21
3.1.2	Software.....	22
3.1.3	Kits, Marker, Standards.....	22
3.1.4	Pufferlösungen, Medien und Chemikalien	23
3.1.5	Allgemeine Lösungen und Puffer	23
3.1.6	Bakterienkultur-Medien.....	23
3.1.7	Zellkulturmedien und Chemikalien	24
3.1.8	Medien zur Fliegenhaltung	24
3.1.9	Niedermolekulare Proteininhibitoren.....	25
3.1.10	Antikörper und Farbstoffe	25
3.1.11	Vektoren	25
3.1.12	Oligonukleotide	26
3.1.13	Bakterienstämme	27
3.1.14	Fliegenlinien.....	28
4	Methoden	29
4.1	Molekularbiologie.....	29
4.1.1	Isolierung von RNA aus Zellen und Gewebe von Drosophila.....	29
4.1.2	Bestimmung der Konzentration und der Qualität von RNA	29
4.1.3	Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	30
4.1.4	Aufreinigung von Plasmid-DNA in kleinem und mittlerem Maßstab	30
4.1.5	Elektrophorese, Aufreinigung und Bestimmung der Konzentration von DNA	31
4.1.6	Isolierung von genomischer DNA.....	31
4.1.7	Sequenzierung	32
4.1.8	Restriktion und Ligation von Plasmiden	32
4.1.9	TOPO-Klonierung von PCR-Produkten	33
4.1.10	Herstellung und Transformation von chemokompetenten Bakterien	33
4.1.11	Design von Oligonukleotiden.....	34

4.1.12	PCR für Analyse und Klonierung	34
4.1.13	Mutagenese durch PCR.....	35
4.1.14	Quantitative Real Time PCR	36
4.2	Mikrobiologie	37
4.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	37
4.2.2	Escherichia coli	37
4.2.3	Pseudomonas entomophila	37
4.2.4	Erwinia carotovora 15	38
4.3	Zellkultur	38
4.3.1	Kultivieren und Passagieren von Zellen	38
4.3.2	Analyse der Luciferase-Expression	39
4.3.3	Secin-Behandlung und Stimulation mit Insulin	39
4.4	Drosophila melanogaster	39
4.4.1	Haltung und Kreuzung.....	39
4.4.2	GAL4/UAS-System	40
4.4.3	GAL4/UAS GeneSwitch System	40
4.4.4	Fütterung mit chemischen Inhibitoren und Antibiotika	41
4.4.5	Messung der Nahrungsaufnahme mit dem CAFE-Assay.....	41
4.4.6	Überlebensexperimente in Drosophila	42
4.4.7	Analyse der Überlebensexperimente	42
4.4.8	Natürliche Infektion von adulten Fliegen.....	43
4.4.9	Analyse der bakteriellen Belastung des Darms nach natürlicher Infektion	43
4.4.10	Gewebepräparation	44
4.4.11	Immunofluoreszenzfärbung.....	44
5	Ergebnisse	46
5.1	Direkte Regulation von <i>Drosomycin</i> durch FOXO.....	46
5.1.1	Klonierung und Mutagenese des Drosomycin-Promotors.....	46
5.1.2	Transkriptionsanalysen mit Deletionskonstrukten in S2-Zellen	47
5.1.3	Transkriptionsanalysen mit Mutationskonstrukten in S2-Zellen	48
5.2	IIS-abhängige Regulation der Lebensspanne über Steppke.....	49
5.2.1	Überlebensexperimente mit steppke-Mutanten.....	49
5.2.2	Der Steppke-Inhibitor SecinH3.....	51
5.2.3	Überlebensexperimente mit dem Steppke-Inhibitor SecinH3.....	52
5.2.4	Konzentrationsabhängige Effekte von SecinH3	54
5.2.5	Spezifität von SecinH3.....	56
5.2.6	Überlebensexperimente mit SecinH3 in foxo-Mutanten.....	57
5.2.7	Screening nach SecinH3-Varianten	59
5.2.8	Überlebensexperimente mit Secin16.....	60
5.3	IIS-abhängige Regulation der Immunabwehr über Steppke	61
5.3.1	AMP-Expression in steppke-Mutanten	61
5.3.2	Natürliche Infektion von steppke-Mutanten	62
5.4	FOXO-abhängige Regulation der Immunabwehr	63
5.4.1	AMP Expression durch FOXO im Darm	63
5.4.2	Natürliche Infektion nach AMP-Induktion im Darm	64
5.5	Einfluss einzelner AMPs auf die Immunabwehr und die Lebensspanne	66
5.5.1	Überlebensexperimente bei Expression von einzelnen AMPs	66
5.5.2	Expressionsmuster des Tubulin-Treibers im Darm	71
5.5.3	Natürliche Infektion nach Expression einzelner AMPs	72
5.5.4	Auswirkung von Keimreduzierung in der Nahrung durch Antibiotika	74
5.5.5	Darmspezifische Expression von Drosocin.....	77
5.5.6	Überlebensexperimente und natürliche Infektion nach darmspezifischer Expression	

von Drosocin	79
5.5.7 Keimreduzierung durch Antibiotika	80
6 Diskussion.....	82
6.1 Verlängerung der Lebensspanne durch Reduktion der Steppke-Funktion	82
6.2 Fähigkeiten und Grenzen von Steppke-Inhibitoren der Secin-Klasse.....	83
6.3 Die Regulation der Lebensspanne in <i>steppke</i> -Mutanten ist FOXO-abhängig	84
6.4 Die Regulation des Immunsystems in IIS-Mutanten ist FOXO-abhängig	85
6.5 Direkte Regulation von AMPs durch FOXO	86
6.6 FOXO wirkt über die Immunabwehr auf die Lebensspanne	88
6.7 AMPs führen zur Verlängerung der Lebensspanne	90
6.8 Modell	91
7 Statistik.....	93
7.1 Tabelle 1 Überlebensexperimente	93
7.2 Tabelle 2 Relative mittlere Überlebenszeit.....	94
7.3 Tabelle 3 Quantitative Real Time PCR	95
7.4 Tabelle 4 Bakterielle Belastung	95
7.5 Tabelle 5 CAFE-Assay	96
8 Abkürzungsverzeichnis.....	97
9 Abbildungsverzeichnis	98
10 Literaturverzeichnis	99
11 Anhang	107
11.1.1 Genomische DNA-Sequenz des Drosomycin-Lokus	107
12 Danksagung	109

1 Zusammenfassung

Die Regulation der Lebensspanne durch den Insulinsignalweg (IIS) ist evolutionär konserviert und wird vor allem in *C. elegans*, *Drosophila* und der Maus untersucht. Es ist eine Reihe von Genen bekannt, die Bestandteile der Signalkaskade kodieren und deren Mutation eine Reduktion der Signalwegsaktivität und eine Verlängerung der Lebensspanne zur Folge haben. Eine solche Reduktion bewirkt eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO, eines hoch konservierten Regulators der Energiehomöostase, der Stressresistenz und von Alterungsprozessen. Es gibt deutliche Hinweise, dass der Einfluss des IIS auf die Lebensspanne von *Drosophila* von der Regulation durch FOXO abhängig ist. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist allerdings noch unbekannt und wird intensiv gesucht. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Frage, ob FOXO durch die transkriptionelle Regulierung von Antimikrobiellen Peptiden (AMPs) - Effektormolekülen des angeborenen Immunsystems - zur Verlängerung der Lebensspanne beiträgt. Experimente in Zellkultur zeigen eine direkte transkriptionelle Aktivierung des *Drosomycin*-Promotors durch FOXO. Die Aktivierung erfolgt über konservierte Bindemotive, die in den regulatorischen Regionen fast aller AMPs zu finden sind. Wie bereits für andere IIS-Komponenten bekannt, ist die Reduzierung der Steppke-Funktion durch Mutation oder Inhibition auf Proteinebene mit einer Verlängerung der Lebensspanne verbunden. Eine effektive Inhibition kann durch die niedermolekulare Verbindung SecinH3 erzielt werden, die in dieser Arbeit in ihrer Wirkung auf adulte Fliegen charakterisiert wird. Im Darm langlebiger *steppke*^{K/SH}-Mutanten oder nach darmspezifischer Überexpression von *foxo* in wildtypischen Tieren werden AMPs aktiviert. Das führt zu einer verbesserten Immunabwehr, wie die verringerte bakterielle Belastung des Darms nach natürlicher Infektion mit dem *Drosophila*-Pathogen *Pseudomonas entomophila* zeigt. Durch die Verwendung eines chemisch induzierbaren Expressionssystems können die Transkriptlevel einzelner AMPs im Darm reguliert werden, was im Fall von *Drosocin* und eine Verlängerung der Lebensspanne zur Folge hat. Der Effekt bleibt aus, wenn die Tiere unter keimreduzierten Bedingungen gehalten werden.

Zusammengefasst führen diese Ergebnisse zu dem Schluss, dass in IIS-Mutanten die dauerhafte, FOXO-abhängige Induktion von AMPs im Darm zur verlängerten Lebensspanne beitragen kann. AMPs werden als neue Gruppe von Effektormolekülen charakterisiert, die

einen direkten Einfluss auf die Lebensspanne von *Drosophila* haben. Über FOXO ist der Organismus damit in der Lage, seine Immunabwehr in Barriereepithelien - wie dem Darm - abhängig von seinem physiologischen Zustand und unabhängig von den klassischen Immunsignalwegen zu modulieren. Über die gesamte Lebenszeit verringert sich für die Fliege so die Wahrscheinlichkeit einer pathogenen Infektion und führt damit zu einer längeren Lebensspanne.

2 Einleitung

2.1 Der Insulinsignalweg

Der Insulinsignalweg (IIS) ist einer der wichtigsten metabolischen Signalwege in höheren Organismen. Sein Grad der Konservierung zwischen Säugetieren und Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* (*Drosophila*) ist sehr hoch, sowohl auf genetischer als auch auf funktioneller Ebene (Teleman, 2009). Seine bekannteste Funktion ist die eines Sensors für Nährstoffe, die einem Organismus zur Verfügung stehen (Britton et al., 2002), und daraus folgend die Bewahrung der Energiehomöostase, also die Regulation der beiden gegenläufigen Prozesse der Nährstoffspeicherung und Nährstoffaktivierung. Besonders bekannt ist beim Menschen die Rolle des Insulinsignalwegs bei der Regulation des Glukosestoffwechsels (Taha und Klip, 1999). Ist diese Regulation gestört, kommt es bei Säugetieren zu der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus. Weitere wichtige Funktionen in Säugetieren und in *Drosophila* hat der Insulinsignalweg in der Ribosomenbiogenese, der Endozytose, der Autophagozytose, der Fortpflanzung, der zellulären Anpassung an Stress (Grewal, 2009), der Kontrolle von zellulärem und organischem Wachstum (Hafen, 2004; Hietakangas und Cohen, 2009) und der Regulation der Lebensspanne (Fontana et al., 2010; Partridge et al., 2011).

2.1.1 Der Insulinsignalweg in *Drosophila*

Der *Drosophila* Insulin Like Receptor (InR) kann von acht Insulin Like Peptides (ILP) aktiviert werden, von denen vier in neuroendokrinen Zellen im Gehirn produziert werden (Colombani et al., 2012; Ikeya et al., 2002). Die ILPs sind ein gutes Beispiel für die hohe Konservierung des Insulinsignalwegs auf Proteinebene, denn auch humanes Insulin ist in der Lage, den InR in *Drosophila* zu binden und zu aktivieren (Brogiolo et al., 2001). Die individuellen Funktionen der einzelnen ILPs werden zur Zeit ausführlich erforscht werden. Der durch ILP-Aktivierung autophosphorylierte InR bindet das Protein Chico (Bohni et al., 1999), ein Homolog des humanen Insulin Receptor Substrates (IRS), rekrutiert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) an die Plasmamembran der Zelle und aktiviert sie (Leevers et al., 1996). Die

Kinase bewirkt eine Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), einer Gruppe von Phospholipiden, die in die Plasmamembran integriert sind. Es kommt zu einer Akkumulation von PIP₃, was zu einer Membranrekrutierung der Proteinkinase B Akt (PKB/Akt) über deren Pleckstrin-Homology-Domäne (PH-Domäne) führt. Der Gegenspieler der PI3K ist die Phosphatase PTEN, die eine Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂ durchführt (Teleman, 2010). Auch das Cytohesin Steppke wirkt auf der Ebene der PI3K, doch der Mechanismus der Interaktion mit dem Signalweg ist bisher noch unbekannt (Fuss et al., 2006). PKB/Akt ist eine der Schlüsselkomponenten des Insulinsignalwegs. Sie deaktiviert durch Phosphorylierung den katabolen Forkhead-Box-O-Transkriptionsfaktor (FOXO). Phosphoryliert wird FOXO im Cytoplasma gehalten und kann nicht in den Zellkern eindringen, wo er seine Zielgene wie z.B. den translationalen Repressor 4E-BP (4E-Binding Protein) transkriptionell aktivieren könnte (Gingras et al., 1998; Miron et al., 2001; Puig et al., 2003). Von PKB/Akt wird auch eine Reihe weiterer metabolischer Regulatoren beeinflusst, die nicht zum Insulinsignalweg gehören und deren Funktionen bisher hauptsächlich in Säugetieren beschrieben sind (Grewal, 2009; Teleman, 2010). Die Kinase PKB/Akt stellt auch die Verbindung zum zweiten Zweig des Insulinsignalwegs her, zur TOR (Target of Rapamycin)-Kaskade. Dies geschieht über die Inhibierung des TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex)-Komplexes, und zwar vermutlich durch Phosphorylierung. TSC2 wirkt als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für die GTPase Rheb (Ras-homolog-enriched-in-brain). Rheb wiederum ist in der Lage, die Kinase TOR, eine weitere Schlüsselkomponente des Insulinsignalwegs, zu aktivieren. Diese wiederum aktiviert z.B. die Translationsregulatoren S6K (Ribosomal Protein S6-p70-Protein Kinase) und 4E-BP, was beides eine Reduktion der Proteinbiosynthese und Einsparung von Energiereserven der Zelle und des Organismus zur Folge hat (Hay und Sonenberg, 2004).

Die hier beschriebenen Proteine und ihre Interaktionen stellen nur das Grundgerüst des weitaus komplexeren Insulinsignalwegs und seiner Verknüpfungen mit anderen metabolischen Kaskaden dar (Grewal, 2009; Hay und Sonenberg, 2004; Teleman, 2010). Die zwei für diese Arbeit wichtigsten Komponenten werden in den nächsten beiden Abschnitten näher beschrieben.

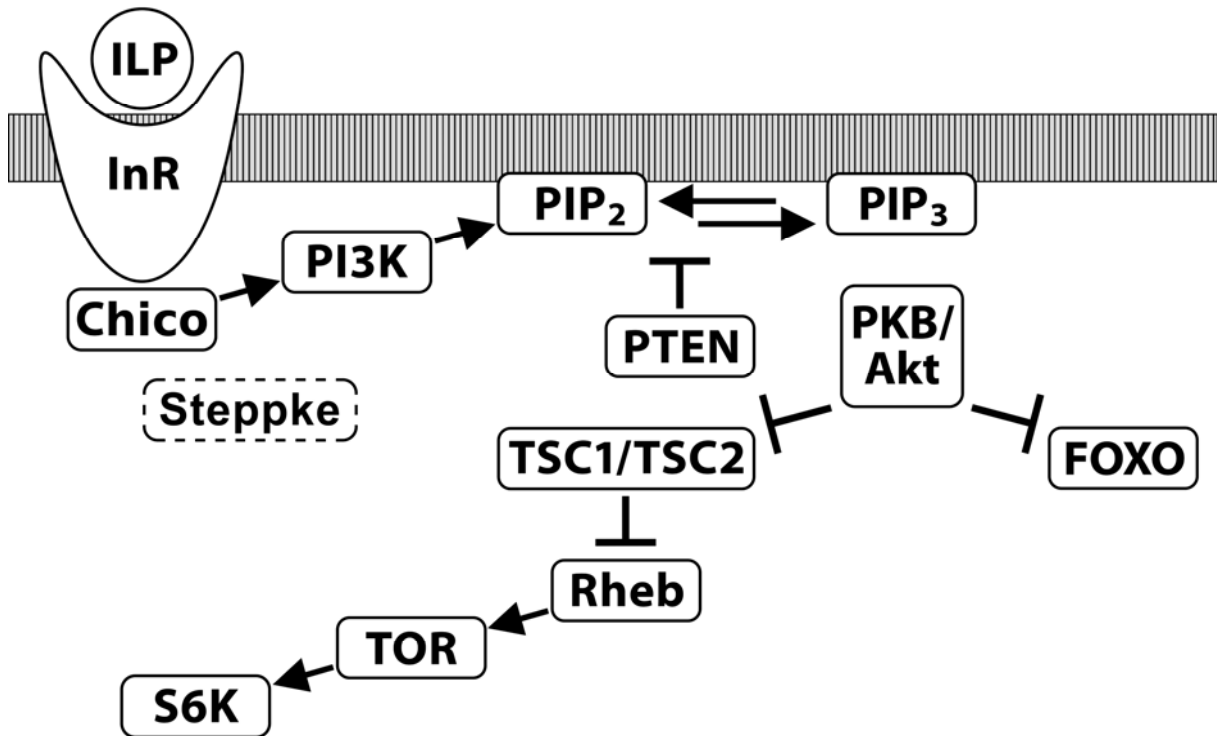


Abbildung 1 Der Insulinsignalweg. Schematische Darstellung wichtiger Komponenten der Kaskade und ihrer Wirkung bei aktiviertem Signalweg.

2.1.2 Der FOXO-Transkriptionsfaktor

FOXO ist der Namensgeber für eine ganze Unterfamilie der FOX (Forkhead-Box)-Transkriptionsfaktoren, deren gemeinsames Merkmal die etwa 100 Aminosäuren lange, konservierte Forkhead-Bindedomäne ist. In Säugetieren gibt es mehrere Mitglieder der FOXO-Familie, in *Drosophila* existiert nur ein einziges FOXO-Homolog, das auch eine sehr starke Homologie zum einzigen Vertreter der Familie im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) DAF-16 (Dauerformation-16) aufweist (Kramer et al., 2003). Alle FOXOs können durch eine Reihe von Kinasen reguliert werden, darunter einige durch die Kinase PKB/Akt des Insulinsignalwegs.

Auch in *Drosophila* wird FOXO von der Kinase PKB/Akt phosphoryliert, wodurch der Transkriptionsfaktor im Cytoplasma der Zelle zurückgehalten und inaktiv wird. Im aktiven Status gelangt FOXO in den Zellkern und induziert die Transkription seiner Zielgene (Van Der Heide et al., 2004). Im Insulinsignalweg ist FOXO ein weiterer Schlüsselfaktor, mit einem vielfältigen Einfluss auf den Metabolismus der Zelle und des gesamten Organismus. Seine

Aktivierung führt zur Reduzierung des Energieverbrauchs bis hin zu katabolen Prozessen. Eine FOXO-Überexpression in Larven verzögert die Entwicklung und stoppt die Zunahme der Zellzahl und -größe. Morphologisch entwickelt sich unter diesen Bedingungen der gleiche Phänotyp, den man auch beim Hungern der Larven beobachten kann (Junger et al., 2003; Kramer et al., 2003). In den letzten Jahren ist eine Reihe weiterer Prozesse in *Drosophila* direkt mit der Transkriptionsregulation durch FOXO verknüpft worden, wie z.B. die Stressresistenz (Junger et al., 2003) und die Regulation der Lebensspanne (Hwangbo et al., 2004; Salih und Brunet, 2008; Slack et al., 2011). Es wurden bereits hunderte mögliche Zielgene von FOXO identifiziert (Alic et al., 2011; Gershman et al., 2007; Puig et al., 2003). Drei Beispiele für Zielgene, bei denen die FOXO-Regulation nachgewiesen ist, werden im Folgenden kurz beschrieben.

Ist das Nährstoffangebot des Organismus niedrig und damit auch die Aktivität des Insulinsignalwegs reduziert, führt dies zu einer transkriptionellen Aktivierung der *Lipase 4*. Dadurch kommt es zur intrazellulären Lipolyse und Freisetzung von freien Fettsäuren, die dann zur Energiegewinnung bereit stehen. Auf diese Weise ist FOXO direkt an der Lipidhomöostase von *Drosophila* beteiligt (Vihervaara und Puig, 2008).

Ein weiterer Prozess, der bei reduzierter Aktivität des Insulinsignalwegs von FOXO gesteuert wird, ist die Regulierung der Expression von *4E-BP*, einem translationalen Repressor. Diese Regulierung führt nicht zu einer Freisetzung von Energiereserven, aber zur Reduzierung des Energieverbrauchs durch die Repression des Translationsapparates und damit der Proteinbiosynthese (Teleman et al., 2005). Zusätzlich wird 4E-BP auch über den TOR-Zweig des Signalwegs auf Proteinebene durch Phosphorylierung reguliert (Miron et al., 2003).

Die transkriptionelle Induktion des *InR* durch FOXO bei reduzierter Insulinsignalwegsaktivität ist ein Rückkopplungsmechanismus, mit dem sich der Signalweg selbst reguliert. Er hat eine Erhöhung der Anzahl an InRs in der Plasmamembran zur Folge und damit eine Erhöhung der Sensibilität des Signalwegs für seine Liganden (Puig und Tjian, 2005).

Bisher ist nur ein Teil der Mechanismen beschrieben, mit denen FOXO in die metabolischen Vorgänge in *Drosophila* eingreift. Die Komplexität der Zusammenhänge liegt in der unterschiedlichen Wirkung dieser Mechanismen, abhängig von dem Alter, dem Entwicklungsstadium und dem Gewebe, in dem sie stattfinden. Dies gilt insbesondere für die in dieser Arbeit wichtige Frage, wie FOXO Einfluss auf die Regulation der Lebensspanne der Fruchtfliege nimmt (Slack et al., 2011).

2.1.3 Das Cytohesin Steppke

Im Zuge eines Screenings nach Genen, die für die Regulation des larvalen Wachstums von *Drosophila* verantwortlich sind, wurde vor einigen Jahren das Gen *steppke* identifiziert. Der Name leitet sich vom Phänotyp der Mutante ab, die im larvalen und dadurch auch später im adulten Stadium deutlich kleiner als wildtypische Fliegen ist (Fuss et al., 2006). Steppke gehört zu der Familie der cytoplasmatisch lokalisierten Cytohesine, die von *C. elegans* bis zum Menschen konserviert sind (Kolanus et al., 1996). Nicht beschrieben sind Cytohesine für Prokaryoten und Hefen. In *Drosophila* ist Steppke das einzige Mitglied dieser Familie, im Menschen sind die Cytohesine 1 bis 4 bekannt. Die größte genetische Ähnlichkeit besteht innerhalb der Familie zwischen dem humanen Cytohesin-3, dem murinen Cytohesin-3 und Steppke in *Drosophila* (Fuss et al., 2006).

Cytohesine sind kleine Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (Small Guanine Nucleotide Exchange Factors, small GEFs), die bei ADP-Ribosylierungs-Faktoren (ADP Ribosylation Factors, ARFs) den Austausch von GDP zugunsten von GTP vermitteln. ARFs wiederum gehören zur Klasse der Ras-like GTPasen (Jackson und Casanova, 2000; Randazzo et al., 2001). Die beiden konservierten, funktionell beschriebenen Bereiche der Cytohesine sind die Sec7- und die PH-Domäne. Die Sec7-Domäne führt den Austausch der Guaninnukleotide aus, während die PH-Domäne für die Lokalisierung an der Plasmamembran der Zelle über Inositol-Phospholipid-Bindung verantwortlich ist (Klarlund et al., 1997; Kolanus et al., 1996). Außerdem verfügen die Cytohesine über eine N-terminale Coiled-Coil-Struktur zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen (Abb. 2).



Abbildung 2 Domänenstruktur von Steppke. Die Proteindomänen von Steppke sind in der Cytohesin-Familie konserviert.

Trotz ihrer genetischen Ähnlichkeit werden in den verschiedenen Organismen sehr unterschiedliche Funktionen der Cytohesine beschrieben. Im Menschen sind sie an der Regulierung des intrazellulären Vesikeltransports sowie an der Zelladhäsion und -migration

über β -Integrine beteiligt (D'Souza-Schorey und Chavrier, 2006; Geiger et al., 2000; Kolanus, 2007). In *Drosophila* und in der Maus wurde Steppke als wesentlicher Bestandteil des Insulinsignalwegs beschrieben (Fuss et al., 2006; Hafner et al., 2006).

In *Drosophila* ist die Körpergröße von *steppke*-Mutanten gegenüber wildtypischen Fliegen verringert, was sowohl auf eine Reduktion der Zellgröße als auch auf eine geringere Zellzahl des Organismus zurückzuführen ist (Abb. 3). Dieser Phänotyp, der auch für andere Insulinsignalwegsmutanten, wie z.B. für die Mutante des Gens *chico*, beschrieben ist, führte zur Einordnung von Steppke in den Insulinsignalweg. Auf welche Weise Steppke dort wirkt, konnte bisher noch nicht gezeigt werden, aber durch genetische Experimente ließ sich das Protein innerhalb der Signalkaskade vor der PI3K einordnen (Fuss et al., 2006).



Abbildung 3 *Drosophila steppke*-Mutante. Phänotyp des gestörten Größenwachstums in weiblichen adulten *Drosophila*. Links ist eine Kontroll-Fliege, rechts eine *steppke*^{K/SH}-Mutante abgebildet.

2.1.4 Secins - Inhibitoren des Cytohesins Steppke

Im Jahr 2006 wurde durch ein Aptamer-Austausch-Screening SecinH3, ein 1,2,4-Triazol-Derivat als Inhibitor der Sec7-Domäne von Cytohesinen entdeckt. Das Screening wurde mit der Sec7-Domäne des humanen Cytohesin-1, an die das Aptamer M69 gebunden war, gegen eine Bibliothek synthetischer Chemikalien durchgeführt (Hafner et al., 2006; 2008) (Abb. 4). In folgenden Experimenten gelang der Nachweis einer hohen inhibitorischen Wirkung von SecinH3 auch für die humanen Cytohesine-2 und -3. Das gleiche gilt für die konservierten Cytohesin-3-Homologe in der Maus, das murine Cytohesin-3, und Steppke in *Drosophila* (Hafner et al., 2006). Außer dem in diesem Screening verwendeten RNA-Aptamer M69 war bisher kein Antagonist für die ARF-GEF-Proteinfamilie der Cytohesine bekannt (Famulok et

al., 2001; Mayer et al., 2001). Zwar ist Brefeldin A in der Lage, die sogenannten großen ARF-GEFs (etwa 200 kDa) in ihrer Funktion zu inhibieren (Donaldson et al., 1992), nicht aber die kleinen ARF-GEFs (etwa 47 kDa), zu denen die Cytohesine gehören (Renault et al., 2003). Niedermolekulare Verbindungen (small molecules) wie SecinH3 sind dadurch definiert, dass ihre Größe eine Molekülmasse von 800 g/mol nicht überschreitet (Abb. 5). Die Mehrzahl der pharmakologischen Wirkstoffe sind Mitglieder dieser Klasse von chemischen Verbindungen, da sie von einem Organismus durch ihre geringe Größe besonders gut, bis hin zur zellulären Ebene, aufgenommen werden können. Mit dem niedermolekularen SecinH3 und den anderen Mitgliedern dieser neuen Klasse von Sec7-Inhibitoren (Secins) steht ein wirkungsvolles Instrument zur funktionellen Untersuchung der Mitglieder der Cytohesin-Familie in verschiedenen Organismen zur Verfügung.

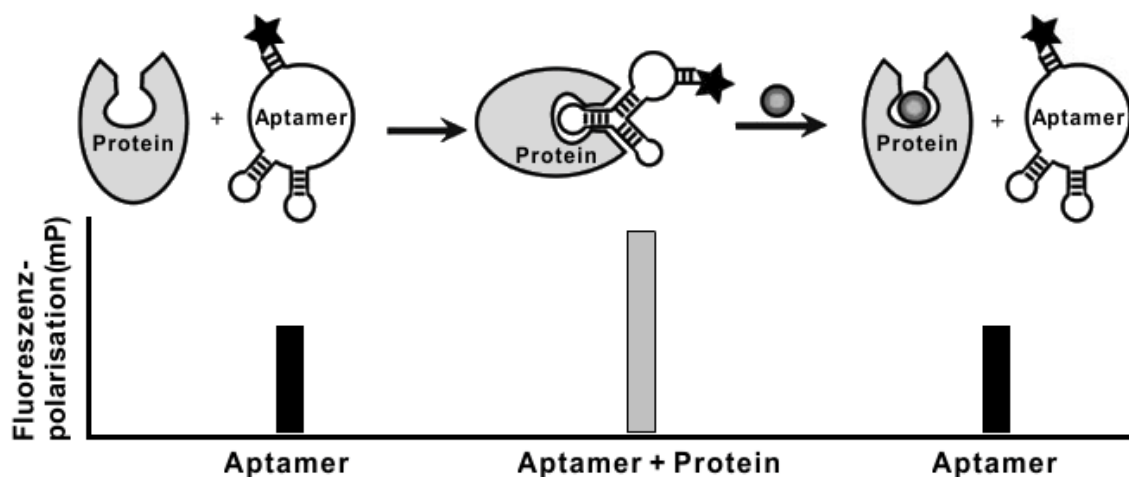


Abbildung 4 Schematische Darstellung eines Aptamer-Screens. Ein proteingebundenes, fluoreszenzmarkiertes Aptamer wird von einer niedermolekularen Verbindung verdrängt. Dieser Vorgang führt zu einer Änderung der Fluoreszenzpolarisation und zur Identifizierung einer erfolgreichen Bindung der getesteten Verbindung.

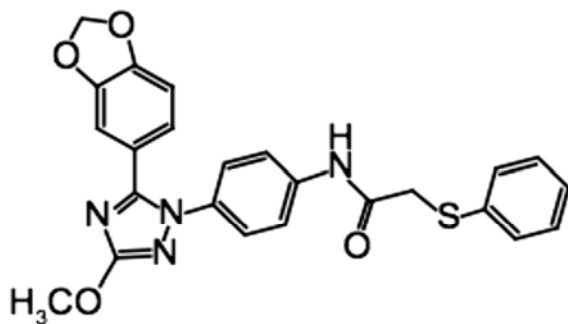


Abbildung 5 Der Cytohesin-Inhibitor SecinH3. Strukturformel der niedermolekularen Verbindung SecinH3.

2.2 Das angeborene Immunsystem

2.2.1 Das angeborene Immunsystem in *Drosophila*

Drosophila ist wie jeder Organismus vielen potentiellen Pathogenen ausgesetzt und verfügt zu seiner Verteidigung über ein angeborenes Immunsystem. Dieses Immunsystem ist in höheren Tieren konserviert, von den Signalwegen, welche die Infektion vermitteln, bis hin zu einer Vielzahl von Effektormolekülen, welche die Pathogene direkt angreifen. Möglicherweise gibt es ein solches oder ein ähnliches System bei allen mehrzelligen Tieren, den Metazoen (Lemaitre und Hoffmann, 2007). Ein adaptives Immunsystem dagegen, wie es sich bei den Vertebraten entwickelt hat, ist bei den Invertebraten, zu denen *Drosophila* gehört, noch nicht beschrieben. Es gibt allerdings erste Hinweise auf die Existenz eines Immungedächtnisses in *Drosophila* (Pham et al., 2007). Der Hauptunterschied der beiden Systeme liegt in der Fähigkeit des angeborenen Immunsystems, auf Pathogene zu reagieren, mit denen es vorher noch keinen Kontakt hatte. Das adaptive System kann dafür Informationen über einen Erreger speichern und so bei einem weiteren Kontakt spezifisch auf ihn reagieren. Durch das Fehlen des adaptiven Systems und der hohen Konservierung des angeborenen Systems ist *Drosophila* besonders geeignet für dessen Erforschung und die Übertragung der Erkenntnisse auf andere Organismen wie den Menschen.

2.2.2 Systemische und lokale Immunabwehr

Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, alle Klassen von Pathogenen, wie Viren, Bakterien, Pilze sowie ein- und mehrzellige Parasiten, zu bekämpfen. Dazu stehen der Fruchtfliege eine Vielzahl höchst unterschiedlicher Effektormoleküle zur Verfügung, die je nach Erreger und Ort der Infektion eingesetzt werden können. Es gibt in *Drosophila* ein mehrschichtiges Abwehrsystem, in dem drei Orte der Abwehr voneinander abzugrenzen sind. Zwei dieser Orte gehören zur sogenannten systemischen, einer zur lokalen Immunabwehr.

Barriereepithelien grenzen den Organismus nach außen ab und bilden die erste Verteidigungslinie, die lokale Immunabwehr, gegen eindringende Pathogene. Zu den

Barriereepithelien mit einer besonders starken Exposition zur Umwelt zählen die Epidermis, das Tracheen- und das Verdauungssystem. Neben der Bildung einer physischen Barriere sind diese Epithelien in der Lage, Moleküle zu produzieren, die gegen eindringende Erreger wirken. Im Darm von *Drosophila* wurde ein System beschrieben, das bei lokaler Infektion mit Bakterien zur Produktion von zytotoxischen Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, Reactive Oxygen Species) führt (Ha et al., 2005; Ritsick et al., 2004). Zusätzlich können erregerspezifisch viele unterschiedlich wirkende Antimikrobielle Peptide (AMPs) exprimiert werden (Lemaitre et al., 1997; Tzou et al., 2000). Beide Mechanismen sind auch für den Darm von Säugetieren beschrieben (Bulet et al., 2004; Ritsick et al., 2004).

Die systemische Immunantwort wird von der zellulären Abwehr in der Hämolymphe und vom Fettkörper der Fruchtfliege gebildet. Der Fettkörper mit direktem Kontakt zur Hämolymphe erstreckt sich vom Kopf bis in den Thorax der adulten Fruchtfliege. Er dient als Fettspeicher und ist ein metabolisch hoch aktives Gewebe. Er wird aber auch als Hauptimmunorgan von *Drosophila* gesehen, da er bei einer Infektion sehr große Mengen AMPs exprimiert und in die Hämolymphe abgibt (Uvell und Engstrom, 2007).

Die zelluläre Immunantwort wird von den Hämozyten gebildet. Ursprung der Hämozyten, der Immunzellen in der Hämolymphe, ist die Lymphdrüse, die hauptsächlich während des larvalen Stadiums und der Metamorphose von *Drosophila* aktiv und im adulten Stadium nicht mehr vorhanden ist. Es sind bisher drei immunologisch aktive Zelltypen beschrieben (Williams, 2007). Plasmatozyten haben die Fähigkeit, Pilze und Bakterien durch Phagozytose aufzunehmen (Kocks et al., 2005). Größere Erreger wie Parasiten können über Einkapselung durch Lamellozyten bekämpft werden, wie dies für die parasitische Wespe *Leptopilina boulardi* gezeigt wurde (Russo et al., 1996). Die Erreger werden in beiden Fällen durch lysosomale Enzyme, ROS und Stickoxide zerstört (Lemaitre und Hoffmann, 2007). Kristallzellen zerstören Mikroorganismen durch Melanisierung. Die für die Umwandlung von Tyrosin zu Melanin benötigte Prophenoloxidase in diesen Zellen in kristalliner Form gespeichert und wird in der Nähe von Erregern freigesetzt. Die bei dem Prozess der Melanisierung entstehenden Verbindungen sind zum großen Teil zytotoxisch und bewirken die Zerstörung der Mikroorganismen (Meister, 2004).

Der bereits ausgiebig erforschte Prozess der Phagozytose durch Plasmatozyten in Invertebraten ist homolog zu dem der Makrophagen und Granulozyten in Vertebraten. Die beiden anderen und einige hier nicht erwähnte Prozesse der zellulären Immunabwehr sind

noch weitgehend unerforscht und weisen auch viel weniger Ähnlichkeit zu den Vertebraten auf. Zwei der offenen Fragen sind, wie die vermutete Kommunikation zwischen Hemozyten und den immunologisch aktiven Geweben der Fruchtfliege und wie die nicht bakterielle Pathogenerkennung funktionieren. Über eine Rolle von AMPs in dieser Funktion wird zur Zeit diskutiert (Meister, 2004; Uvell und Engstrom, 2007).

2.2.3 Antimikrobielle Peptide

AMP ist der Sammelbegriff für eine Reihe sehr unterschiedlich aufgebauter, kleiner, kationischer Peptide, die eine antimikrobielle Wirkung entfalten können. Obwohl einige homologe Peptide in verschiedenen Organismen zu finden sind, ist die evolutionäre Konservierung der meisten Peptidsequenzen nicht besonders hoch. Die Gruppe der AMPs definiert sich über ihre Funktion (Lai und Gallo, 2009). Sie sind die wichtigsten Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems aller Tiere, dienen aber auch Pflanzen und sogar Bakterien als Schutz vor pathogenen Mikroorganismen (Bulet et al., 2004). Es wurden bisher über 1000 AMPs vorhergesagt. Einige der davon identifizierten AMPs wirken sehr spezifisch, andere weisen ein breites Wirkungsspektrum auf. Als Ziele wurden in erster Linie Bakterien beschrieben. AMPs wirken aber auch gegen Pilze, Parasiten und sogar Viren, wobei der Wirkmechanismus meist noch unbekannt ist (Lai und Gallo, 2009). Was die Wirkung vieler AMPs auf Bakterien angeht, wird ein Mechanismus angenommen, bei dem das kationische Peptid in die nach außen negativ geladene Zellmembran eindringt, ihre Permeabilität verändert und Kanäle bildet. Dieser Mechanismus der Lyse der Zellen wurde erstmals für Defensine beschrieben (Boman, 1995). Die Folge ist entweder die Lyse der Membran oder ein Eindringen von intrazellulär wirkenden AMPs. Mit der cholesterolphaltigen, neutralen Plasmamembran von eukaryotischen Zellen können AMPs nicht interagieren (Zasloff, 2002).

Isoliert wurde das erste AMP aus der Motte *Hyalophora cecropia*, Namensgeberin für die Gruppe der Cecropine (Hultmark et al., 1980; Steiner et al., 1981). In den folgenden Jahren wurden viele neue Erkenntnisse über AMPs in Insekten gewonnen, vor allem über die Regulation ihrer Expression. Spätestens mit der Entdeckung der Rolle von AMPs für den Menschen, besonders für die Abwehr von Pathogenen an Barriereepithelien wie der Haut

(Harder et al., 1997; Schonwetter et al., 1995), wurde klar, wie wichtig angeborene Abwehrmechanismen auch für Wirbeltiere sind, die sich nicht allein auf ein adaptives Immunsystem verlassen können. Die beiden Systeme arbeiten vielfältig zusammen (Lai und Gallo, 2009), wie das Beispiel der Interaktion von Defensinen mit dem adaptiven Immunsystem in der menschlichen Haut zeigt. Defensine wirken dabei als Sensoren für eine Infektion und führen als Chemokine dendritische Zellen und T-Zellen an den Infektionsort heran (Chertov et al., 2000; Yang et al., 2000). Die vielfältigen Eigenschaften von AMPs, ebenso ihr Potenzial als therapeutische Alternative zu den bekannten Antibiotika, werden gerade erst entdeckt (Baltzer und Brown, 2011; Kang et al., 2012).

2.2.4 Antimikrobielle Peptide in *Drosophila*

Auch in *Drosophila* bilden die AMPs nicht die einzige, aber die wichtigste und am besten beschriebene Gruppe von Effektormolekülen des angeborenen Immunsystems, vor allem in der lokalen Immunabwehr (De Gregorio et al., 2001; Lemaitre und Hoffmann, 2007). Es sind bisher acht verschiedene Klassen von AMPs beschrieben, die sich in ihrer Wirkung gegen Mikroorganismen und ihrer gewebespezifischen Regulation unterscheiden (Uvell und Engstrom, 2007). Im Fall einer Infektion werden AMPs transkriptionell aktiviert und erreichen innerhalb weniger Stunden ihre maximale Transkriptionsrate. Dabei werden je nach infiziertem Gewebe und abhängig vom Erreger unterschiedliche Kombinationen von AMPs aus den sieben induzierbaren Klassen aktiviert (Tzou et al., 2000) (Abb. 6).

Vermittelt wird die infektionsabhängige Expression von AMPs in *Drosophila* von den beiden auch in Vertebraten konservierten Signalwegen Toll und Imd (Immune Deficiency) (Lemaitre et al., 1995; 1996). Die Toll-Kaskade wird dabei vor allem durch gram-positive Bakterien und Pilze aktiviert, der Imd-Signalweg durch gram-negative Bakterien. Erkannt werden dabei Moleküle der Erreger durch extrazellulär frei bewegliche oder membrangebundene Rezeptoren, sogenannte PRRs (Pattern Recognition Receptors) (Ferrandon et al., 2007). Bei beiden Kaskaden führt die Signalweiterleitung zu einer Translokation von Transkriptionsfaktoren der Relish (Rel)-Familie in den Zellkern, wo sie an NfκappaB-Bindemotive in den Promotoren der AMPs binden und deren Expression bewirkt. Die Transkriptionsfaktoren des Toll-Signalwegs sind Dorsal und DIF (Dorsal-related Immunity

Factor), der Transkriptionsfaktor des Imd-Signalwegs ist Relish (Lemaitre und Hoffmann, 2007). Neben den AMPs regulieren die beiden Kaskaden die Transkription von 80 % aller durch eine Infektion induzierten Gene (De Gregorio et al., 2002). Weitere Signalwege der Immunabwehr, die aber nicht zu einer Expression von AMPs führen, sind der an der Wundheilung beteiligte c-Jun N-terminal Kinase Signalweg (JNK) (Ramet et al., 2002) und der an der Gewebereparatur beteiligte JAK/STAT-Signalweg (Agaisse et al., 2003).

In den Barriereepithelien werden AMPs auch konstitutiv exprimiert, damit diese Gewebe auf den Kontakt mit Pathogenen vorbereitet sind. Zusätzlich dienen AMPs auch zur Regulation der Homöostase der kommensalen Mikroflora, die alle Barriereepithelien besiedelt (Uvell und Engstrom, 2007). Die Regulation der konstitutiven Expression ist dabei unabhängig von den Mechanismen der infektionsabhängigen Expressionskontrolle. Sie wird von gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren gesteuert, die aber - wie auch ihre Regulationsmechanismen - in fast allen Fällen noch unbekannt sind (Lemaitre und Hoffmann, 2007). Im Darm ist der Homöobox-Transkriptionsfaktor Caudal beschrieben, der die AMP-Expression reprimiert. Ohne Caudal-Protein steigt die Expressionsrate der AMPs und hat eine Störung der Homöostase der kommensalen Bakterien im Darm zur Folge. Die daraus entstehende Dominanz einer *Gluconobacter*-Spezies schädigt das Darmgewebe und erhöht dadurch sogar die Sterblichkeit der Fruchtfliege (Ryu et al., 2004; 2008).

Im Darm von *Drosophila* wird das komplexe Zusammenspiel zwischen Pathogenen, der kommensalen Mikroflora und dem Immunsystem des Barriereepithels besonders deutlich, wenngleich dies auch an den anderen Grenzflächen des Organismus zur Umwelt stattfindet.

Antimikrobielles Peptid	Anzahl der Gene	Stärkste Wirkung gegen
Drosocin	1	Gram-negative Bakterien
Diptericin	2	Gram-negative Bakterien
Attacin	4	Gram-negative Bakterien
Cecropin	4	Gram-negative Bakterien
Defensin	1	Gram-positive Bakterien
Metchnikowin	1	Pilze
Drosomycin	7	Pilze

Abbildung 6 Antimikrobielle Peptide in *Drosophila*. Bisher sind sieben Klassen von induzierbaren AMPs identifiziert worden.

2.3 Altern und Lebensspanne

2.3.1 *Der Prozess des Alterns*

Tiere haben höchst unterschiedliche Lebensspannen, von einigen Stunden bis zu über hundert Jahren, abhängig von ihrer ökologischen Nische (Barzilai et al., 2012). In dieser Zeit müssen sie Nachwuchs zeugen, sein Überleben und damit das Überleben der eigenen Art sichern. Diesem Ziel dienen mehrere Lebensphasen. Zuerst wird der Entwicklungsprozess zu einem selbständigen Organismus abgeschlossen, darauf folgt eine Phase der geschlechtlichen Reifung. Sie ist meist bestimmt durch ein Größenwachstum und - besonders bei weiblichen Tieren - durch das Sammeln von Energiereserven als Vorbereitung der Versorgung des Nachwuchses. Bei einigen Organismen, wie der Fruchtfliege, ist diese Phase unterbrochen von der Metamorphose, einer fundamentalen Umstrukturierung des gesamten Organismus. Bei vielen Vertebraten ist diese Phase auch bestimmt durch das Üben erblicher Verhaltensrepertoires oder durch soziales Lernen, wie es vor allem bei den Säugetieren ausgeprägt ist. Das Ziel dieser Bemühungen ist die Fortpflanzung, die wiederum höchst variabel mehrere Zyklen umfassen kann. Es folgt bei einigen Tieren die Brutpflege und vornehmlich bei Säugetieren eine von sozialen Aufgaben bestimmte Lebenszeit, auch nach Ende der Fortpflanzungsfähigkeit.

Jeder Organismus ist dabei dem Altern unterworfen, also einem Abnutzungs- und Beschädigungsprozess, vor dessen Ende alle oben beschriebenen Phasen durchlaufen werden. Genetisch müssen also die Voraussetzungen geschaffen worden sein, gegen alle schädlichen innerlichen und äußerlichen Einflüsse das Überleben zu sichern und das Altern zu verzögern. Innerliche Einflüsse sind z.B. somatische Mutationen oder zytotoxische Stoffwechselprodukte, äußerliche Einflüsse können Verletzungen, Strahlung oder pathogene Mikroorganismen sein (Kirkwood und Austad, 2000).

Es gibt bisher keine einheitliche Theorie, die das Altern evolutionär oder mechanistisch erklärt (Kirkwood, 2005; Vijg und Campisi, 2008). Man geht aber davon aus, dass keine genetischen Programme für den Tod existieren, sondern es vielmehr eine Reihe von Mechanismen gibt, welche die Folgen schädlicher Einflüsse auf den Organismus über die Lebensspanne mindern (Kirkwood, 2005). Im Zusammenhang mit Alterungsprozessen wurden bisher vorwiegend sehr komplexe, hoch konservierte Signalwege identifiziert, die an

der Gewebereparatur, der Stressresistenz, der Energiehomöostase und der Immunregulation beteiligt sind, so u.a. auch der Insulinsignalweg (Barzilai et al., 2012; Giannakou und Partridge, 2007; Vijg und Campisi, 2008). Eine der heute gängigsten Vorstellungen über das Altern und die mit ihm zusammenhängenden Phänomene ist in der "Disposable Soma Theory" (Wegwerfkörper - Theorie) zusammengefasst (Kirkwood, 1977) (Abb.7): Die energetische Investition in den Schutz und den Erhalt des somatischen Gewebes führt zu einer Verlängerung der Lebensspanne. Dem entgegen steht die notwendige Investition in Wachstum und Reproduktion, was beides Schäden an somatischem Gewebe verursacht. Dadurch werden erneut energetische Investitionen in Erhalt des Gewebes nötig, da es sonst zu einer Degeneration auf molekularer, zellulärer und organischer Ebene und schließlich zu Erkrankungen kommt (Kirkwood, 2008). Insgesamt sind sowohl Wachstum und Reproduktion, als auch das Hinauszögern des Alterns kostenintensive Prozesse, die miteinander interagieren und eine komplexe, differenzierte Regulation der begrenzten, metabolisch-energetischen Ressourcen erfordern.

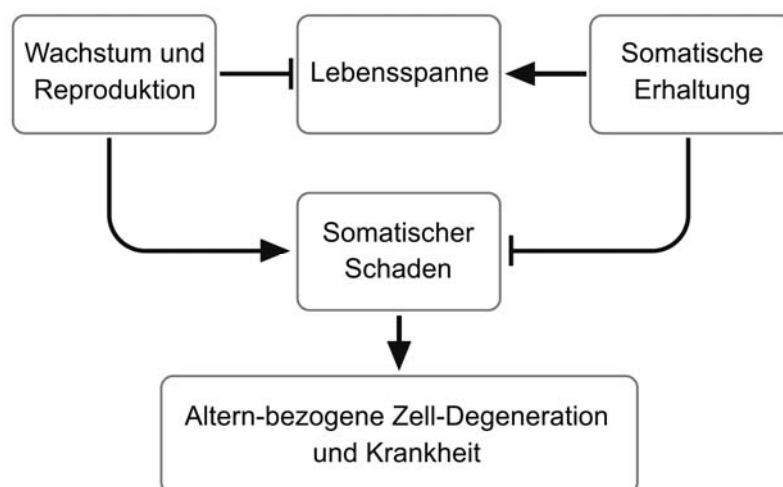


Abbildung 7 Disposable Soma Theory nach Kirkwood. Eine der gängigsten Theorien über das Altern stellt die Verteilung der zur Verfügung stehenden Energiereserven auf den Erhalt des Körpers oder auf Wachstum und Reproduktion gegenüber. Abbildung verändert nach (Vijg und Campisi, 2008).

2.3.2 Altern und Lebensspanne in Drosophila

Drosophila eignet sich neben *C. elegans* für die Erforschung von Alterungsprozessen und Langlebigkeit aus ethischen wie praktischen Gründen besonders gut. Die Lebensspanne

beträgt etwa acht Wochen und ist durch Temperatur, Nahrung und genetische Manipulationen sehr flexibel und messbar zu beeinflussen. Da die am Altern beteiligten Gene und Signalwege evolutionär konserviert sind, lassen sich die Erkenntnisse aus der Fruchtfliege gut auf andere Organismen wie Vertebraten übertragen (Fontana et al., 2010; Paaby und Schmidt, 2009).

Es sind schon eine Reihe von Genen beschrieben worden, die einen Einfluss auf den Alterungsprozess von *Drosophila* haben. Gemessen wird meistens die Verlängerung der Lebensspanne der Tiere, aber auch ihre Gesundheit und Fitness nach der Mutation des untersuchten Gens. Die Auswirkungen einer solchen Mutation sind immer abhängig von äußeren Faktoren, wie der Temperatur, aber auch vom untersuchten Fliegenstamm und vom Geschlecht. Ein gutes Beispiel für die Abhängigkeit vom Geschlecht ist die Verlängerung der Lebensspanne bei homozygoter Mutation des Gens *chico*. Weibliche Mutanten leben 50 % länger, männliche Tiere dagegen sterben sogar etwas früher (Clancy et al., 2001).

Die meisten beschriebenen Gene sind Bestandteile von Signalwegen, wie dies bei Chico als Komponente des Insulinsignalwegs der Fall ist (Paaby und Schmidt, 2009). Diese Kaskaden sind vor allem an der Regulation der Energiehomöostase und der Verarbeitung von zellulärem Stress beteiligt. Beispiele von Genen, die an der zellulären Stressantwort mitwirken und den Alterungsprozess positiv beeinflussen, sind die Enzyme Catalase und Superoxide Dismutase. Sie sind in der Lage, zytotoxische ROS (reaktive Sauerstoffspezies) zu reduzieren, und ihre Überexpression führt zu einer verlängerten Lebensspanne (Orr und Sohal, 1994). Die Mitglieder der Familie der Hitzeschockproteine (HSP, heat-shock proteins) sind als sogenannte Chaperone an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt und verhindern die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen. Auch ihre Überexpression scheint zu einer verlängerten Lebensspanne zu führen (Tatar et al., 1997; Wang et al., 2004). Die Sirtuine sind eine besonders prominente und gut erforschte Familie von Genen, die an der Regulation der Lebensspanne beteiligt sind. Sie sind hoch konservierte Histon-Deacetylasen, die Genexpression direkt durch die Modifizierung von Histonen beeinflussen können, aber auch indirekt über die Regulation einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, darunter FOXO. Dadurch wirken sie auf fast alle Prozesse ein, die bisher mit Altern in Verbindung gebracht werden, z.B. die Energiehomöostase, die Stressantwort und die Kontrolle von Apoptose (Frankel und Rogina, 2006).

2.3.3 Einfluss des Insulinsignalwegs und FOXO auf die Lebensspanne

Der Insulinsignalweg spielt bei der Regulation der Lebensspanne eine zentrale Rolle. Wie die Kaskade selbst scheint auch seine Funktion in der Regulation der Lebensspanne evolutionär konserviert, wie schon in *C. elegans* und in der Maus nachgewiesen (Giannakou und Partridge, 2007). Bereits für mehrere Komponenten der Kaskade wurde gezeigt, dass sie durch Reduktion der Signalwegsaktivität zu einer Verlängerung der Lebensspanne führen, darunter einige der ILPs, der InR selbst, die Kinase TOR und der Transkriptionsfaktor FOXO (Paaby und Schmidt, 2009). Die erste entdeckte Mutation war 2001 die des Gens *chico*, das *Drosophila*-Ortholog des IRS (Clancy et al., 2001).

Bisher ist der Mechanismus, durch den der Insulinsignalweg auf die Lebensspanne wirkt, noch nicht aufgeklärt. Es wird diskutiert, ob eine Kombination der vielen hier bereits beschriebenen Einflüsse der Kaskade auf den Organismus zur Verlängerung der Lebensspanne führt oder nur ein einzelner Mechanismus (Giannakou und Partridge, 2007). Eine entscheidende Rolle spielt der Transkriptionsfaktor FOXO am Ende der Insulinsignalkaskade. Seine Aktivierung hat eine Verlängerung der Lebensspanne zur Folge, wie erstmals Versuche im Fettkörper von *Drosophila* zeigten (Hwangbo et al., 2004). Es wurde weiterhin gezeigt, dass nicht alle Effekte des Insulinsignalwegs über FOXO vermittelt werden. Versuche in *foxo*-Mutanten weisen aber darauf hin, dass der Einfluss auf die Lebensspanne von dem Transkriptionsfaktor abhängt (Slack et al., 2011). Auch die Regulation durch die Sirtuine sind ein weiterer Hinweis darauf, dass der FOXO-Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle in der Regulation der Lebensspanne von *Drosophila* spielt. Dessen Mechanismus ist jedoch trotz der vielen bekannten Zielgene und Funktionen noch nicht aufgeklärt.

2.3.4 Regulation von AMPs durch den Insulinsignalweg in der Larve

Bei einem kürzlich in *Drosophila* entdeckten neuen Mechanismus zur Regulation der Expression von AMPs sind die klassischen Immunsignalwege Toll und Imd nicht beteiligt. Der Mechanismus ist unabhängig von einer Infektion des Organismus und wirkt unter normalen physiologischen Bedingungen. Er ist abhängig von der Aktivität des Insulinsignalwegs und

damit vom physiologischen Zustand des Tieres. Experimente in *Drosophila*-Larven haben diesen Zusammenhang aufgedeckt. In Mutanten der Signalwegskomponenten Steppke und Chico sind die Transkriptlevel vieler AMPs erhöht. Auch die Reduktion der Signalwegsaktivität durch Inhibierung auf Proteinebene oder das Hungern der Tiere führt zu einer erhöhten Transkriptionsrate von AMPs, selbst wenn die Toll und Imd Signalwege durch Mutation deaktiviert sind. Dieser Mechanismus funktioniert allerdings nicht in *foxo*-Mutanten, denn es ist der FOXO-Transkriptionsfaktor am Ende des Insulinsignalwegs, der die AMP-Genexpression vermittelt (Abb 8). Seine Überexpression führt zu einer transkriptionellen AMP-Aktivierung. Dieser FOXO-abhängige Mechanismus ist zellautonom und wurde sowohl im Fettkörper als auch in Barriereepithelien wie der Epidermis, den Tracheen und dem Darm nachgewiesen. Versuche in humaner Zellkultur deuten auf einen auch in Säugetieren evolutionär konservierten Mechanismus hin (Becker et al., 2010).

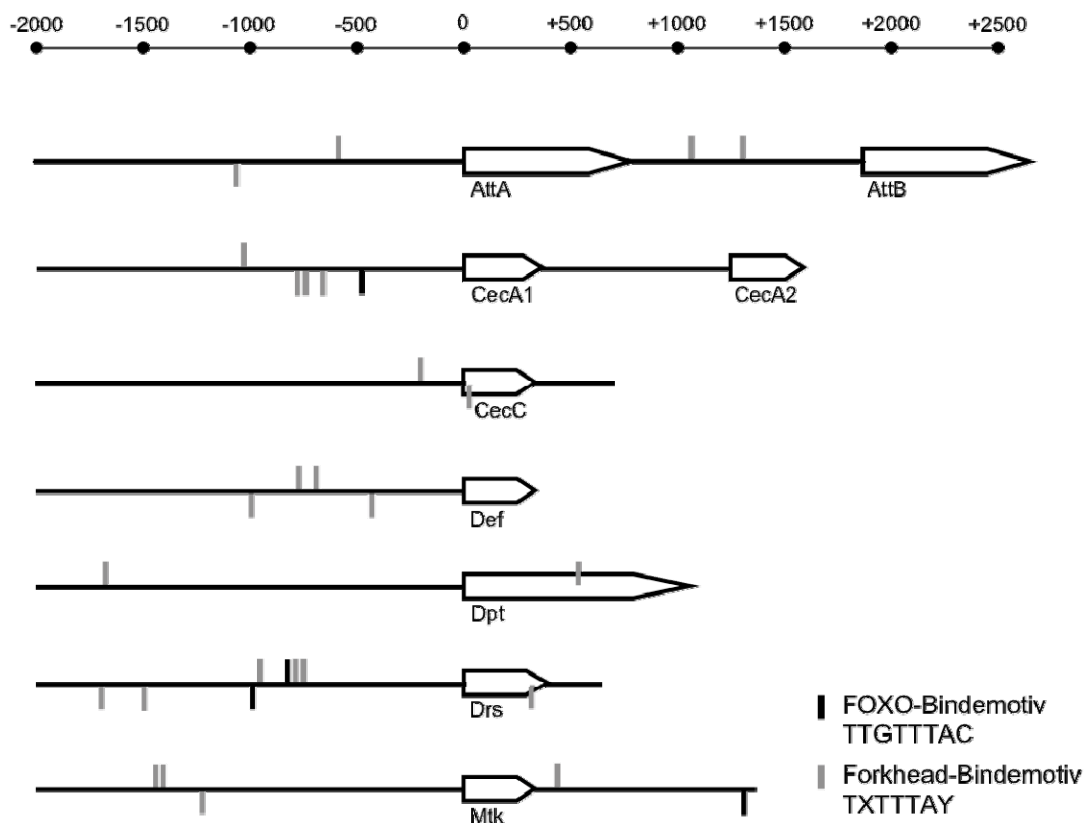


Abbildung 8 Transkriptionelle Aktivierung von AMPs durch FOXO. Schematische Darstellung der Positionen von FOXO- und allgemeinen Forkhead-Bindemotiven in den regulatorischen Bereichen von *Drosophila*-AMPs. Veränderte Abbildung aus (Becker et al., 2010).

2.4 Zielsetzung

Welche biologische Funktion der Mechanismus der FOXO-abhängigen AMP-Regulation im Organismus erfüllt und wie seine Wirkung die klassischen Komponenten des Immunsystems ergänzt, ist bisher noch nicht bekannt. Hinweise aus der aktuellen Forschung deuten auf einen Zusammenhang zwischen den beiden FOXO-abhängigen Einflüssen auf die Immunabwehr und die Regulation der Lebensspanne hin. Dies aufzuklären steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Daneben werden die Möglichkeiten untersucht, den Steppke Inhibitor-SecinH3 als Werkzeug für die Manipulation des Insulinsignalwegs einzusetzen, um die Lebensspanne von *Drosophila* zu verlängern.

3 Materialien

3.1 Allgemeine Materialien

Falls nicht an der entsprechenden Stelle anders angegeben, wurden alle Verbrauchsmaterialien von den Firmen Roth, VWR und Greiner bezogen.

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller und Bezeichnung
Autoklav	Laboklav 55-195, SHP
Bakterien-Inkubator	Model 400, Memmert
Bionokular	Stemi 2000, Zeiss
Feinwaage	BP 211D, Sartorius
Fliegen-Inkubator	Rumed Typ 3201, Rubarth Apparate
Fluoreszenz-Binokular	Discovery V8, Zeiss
Gel-Dokumentation	Alpha Digi Doc, Biozym
Gel-Elektrophorese	Power Pac 3000, BioRad
Homogenisator	Precellys 24, Peqlab
Konfokales Fluoreszenz-Mikroskop	LSM 780, Zeiss
Luminometer	Microlumat Plus LB96V, Berthold
Nanodrop	Nanodrop 2000, Thermo Scientific
PCR-Cycler	PTC-200, MJ Research
Photometer	SmartSpec Plus, BioRad
Real Time PCR-Cycler	CFX96 Detection System, BioRad
Schüttelinkubator	Innova 44, New Brunswick Scientific
Standzentrifuge	Avanti J-26 XP, Beckmann Coulter
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
Tischzentrifuge	5415 R, Eppendorf
Ultra Turrax	Ultra-Turrax T25 basic, IKA
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientific Industries

3.1.2 Software

Anwendung	Software
Grafische Arbeiten	Illustrator CS3, Adobe
Klonierungsstrategie und Primerdesign	Serial Cloner 1.2, Serialbasics
Real Time	CFX Manager Software, BioRad
Tabellenkalulation	Excel 2008 und XLSTAT, Microsoft
Textverarbeitung	Word 2008, Microsoft

3.1.3 Kits, Marker, Standards

Hersteller	Produkte
BioRad	SYBRGreen Supermix
Fermentas	DNA Ladder Mix
	DNA Loading Dye
	Taq Polymerase
Invitrogen	SybrSafe
	TOPO TA Cloning Kit
Macherey Nagel	NucleoSpin Plasmid AX-100
	NucleoSpin Extract II
	NucleoSpin RNA II
Promega	Luciferase Assay System
	Pfu polymerase
	GoTaq polymerase
Qiagen	QuantiTect Reverse cDNA Transcription Kit
Roche	PCR Nucleotide Mix
	Shrimp Alkaline Phosphatase
	T4 DNA Ligase
Stratagene	QuickChange Ligthning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit

3.1.4 Pufferlösungen, Medien und Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen und Medien mit voll entmineralisiertem (VE), sterilem Wasser hergestellt. Medien für Bakterien- und Zellkultur sowie für die Fliegenhaltung wurden autoklaviert. Antibiotika und andere Zusätze wurden bei einer Temperatur von 60 °C hinzugefügt. Alle Chemikalien wurden bei Roth (Karlsruhe) bestellt.

3.1.5 Allgemeine Lösungen und Puffer

Name	Zusammenstellung
Blockierlösung	5 % Ziegen Serum in PBT
Magermilch 3 %	3 g Magermilchpulver in 100 ml PBS
Nipagin Lösung	10 % 4-Hydroxybenzoesäure-methyl-ester in 70 % Ethanol
PBS	130 mM KCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
PBT	0,1 % Tween 20 in PBS
Puffer A	100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5 % SDS
RF1	100 mM RbCl ₂ ; 50 mM MnCl ₂ ; 30 mM KOAc; 10 mM CaCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin
RF2	10 mM Mops; 10 mM RbCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ ; 15 % (v/v) Glycerin (pH 7,0)
TAE	40 mM Tris Acetat (pH 8,0); 1 mM EDTA
TELT	50 mM Tris (pH 7,5); 62,5 mM EDTA; 2,5 M LiCl; 0,4 % Triton X-100
XGal	2 % 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactosidase

3.1.6 Bakterienkultur-Medien

Name	Zusammensetzung
LB-Agar	10 g Difco LB-Medium und 15 g Difco Technical Agar in 1 l VE-Wasser

LB-Medium	10 g Difco LB-Medium in 1 l VE-Wasser
-----------	---------------------------------------

3.1.7 Zellkulturmedien und Chemikalien

Name	Zusammensetzung oder Firma
Cellfectin II	Invitrogen
FCS	Biowest
Humanes Insulin	Sigma
Induktionsmedium	Kulturmedium und 0,5 mM CuSO ₄
Kulturmedium	Schneider's <i>Drosophila</i> -Medium; 10 % (v/v) inaktiviertes FCS; 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
Schneider's <i>Drosophila</i> -Medium	Invitrogen

3.1.8 Medien zur Fliegenhaltung

Apfelsaftagarplatten:

20 g Agar werden in einem Volumen von 1 l mit VE-Wasser aufgeköcht. Anschließend wird die Lösung in einem Wasserbad auf 60 °C abgekühlt, 25 g Zucker gelöst und 10 ml Nipagin-Lösung hinzugefügt.

Standardfliegenfutter:

90 g Fadenagar werden in einem Volumen von 8 l VE-Wasser aufgeköcht. Dann werden unter ständigem Rühren 165 g Bäckerhefe, 615 g Maismehl, 1 l Rübensirup und weitere 3 l VE-Wasser hinzugefügt. Das Futter wird eine Stunde unter gelegentlichem Rühren gekocht und anschließend auf 55 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur werden 200 ml 10 % Nipagin-Lösung (in 70 % Ethanol) hinzugegeben und das Futter abgefüllt.

Fliegenfutter für Überlebensexperimente:

37,5 g autolyseierte Hefe werden mit 10 g Kobe Agar in 300 ml VE-Wasser gelöst, autoklaviert und in einem Wasserbad auf 60 °C abgekühlt. Unter ständigem Rühren werden 37,5 g Glucose, 10 % Nipagin-Lösung (in 70 % Ethanol) und 0,25 % DMSO hinzugegeben. Je

nach experimenteller Fragestellung werden dem Futter jetzt auch Secins, Antibiotika oder Mifepriston (Sigma) zugesetzt. Das Futter wird auf 500 ml mit VE-Wasser aufgefüllt und anschließend abgefüllt.

3.1.9 Niedermolekulare Proteininhibitoren

Name	Quelle
SecinD5	M. Famulok, Bonn (Hafner et al., 2006)
SecinH3	M. Famulok, Bonn (Hafner et al., 2006)
Secin3	AMRI, CGX-03199266 (Stumpfe et al., 2010)
Secin7	AMRI, CGX-02136485 (Stumpfe et al., 2010)
Secin13	AMRI, CGX-01218314 (Stumpfe et al., 2010)
Secin15	AMRI, CGX-01216930 (Stumpfe et al., 2010)
Secin16	ASINEX, BAS00892957 (Stumpfe et al., 2010)
Secin69	Enamine, T5891443 (Stumpfe et al., 2010)
Secin132	VitasM, STK134679 (Stumpfe et al., 2010)

3.1.10 Antikörper und Farbstoffe

Name	Verbunden mit	Quelle	Eingesetzte Verdünnung
Mouse anti-rabbit	Alexa 488	MoBiTec	1 : 200
Phalloidin	Alexa 565	MoBiTec	1 : 100.000
Rabbit anti-GFP	-	I. Zinke, Bonn	1 : 1.000

3.1.11 Vektoren

Name	Quelle
pCR II TOPO	Invitrogen
pGL3-Drs-1-5	I. Zinke, Bonn (Becker et al., 2010)
pGL3-Drs-WT	I. Zinke, Bonn (Becker et al., 2010)
pGL3-Luciferase	M. Boutros, Heidelberg (Becker et al., 2010)

pMT-gal4	I. Zinke, Bonn (Becker et al., 2010)
pUAS-foxo-gfp	B. Fuß, Bonn (Fuss et al., 2006)

3.1.12 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Klonierung der *Drosomycin*-Mutationskonstrukte

Name	Mutations- position	Sequenz 5' - 3'
DBE1	-990	TTATATTGTT CATAGAAATTCAACAATATAAAAAGTAAAGGAAAACGC TATTAGGCCGGATG
DBE2	-964	AAAACGCTATTAGGCCGGATCTTTATATTTTCACGACGAAC
DEB3	-867	TCAAATTTTTTACTTTTTCGGTCGTTTCGAATTCCTTACCGTTTTAT CAGTCTATTATTATG
DBE4+5	-824 und -812	TCAGTCTATTATTATGATGGGCTAGATGTTCTTTATTAGATCTTTATT TAAGAACATTATCAATACAAAAAC

Oligonukleotide für die quantitative Real Time PCR

Primername	Genname	Sequenz
AttA-sy-F1	Attacin A (AttA)	AGG AGG CCC ATG CCA ATT TA
AttA-sy-R1	Attacin A (AttA)	CAT TCC GCT GGA ACT CGA AA
CecA1-sy-F1	Cecropin A1 (CecA1)	TCT TCG TTT TCG TCG CTC TCA
CecA1-sy-R1	Cecropin A1 (CecA1)	ATT CCC AGT CCC TGG ATT GTG
CecC-sy-F1	Cecropin C (CecC)	TCA TCC TGG CCA TCA GCA TT
CecC-sy-R1	Cecropin C (CecC)	CGC AAT TCC CAG TCC TTG AAT
Def Real F2	Defensin (Def)	TGA AGT TCT TCG TTC TCG TGG
Def Real R2	Defensin (Def)	CAC CAG GAC ATG ATC CTC TG
Dpt-RT-F1	Diptericin (Dpt)	ATT GGA CTG AAT GGA GGA TAT GG
Dpt-RT-R1	Diptericin (Dpt)	CGG AAA TCT GTA GGT GTA GGT
Dro-sy-F1	Drosocin (Dro)	TTT GTC CAC CAC TCC AAG CAC
Dro-sy-R1	Drosocin (Dro)	ATG GCA GCT TGA GTC AGG TGA

<i>Drs-sy-F1</i>	<i>Drosomycin (Drs)</i>	ACC AAG CTC CGT GAG AAC CTT
<i>Drs-sy-R1</i>	<i>Drosomycin (Drs)</i>	TTG TAT CTT CCG GAC AGG CAG
<i>foxo-sy-F1</i>	<i>foxo</i>	AGC TTG GAA GGA CAA TGC CT
<i>foxo-sy-R1</i>	<i>foxo</i>	ATT GCA CTC GAG ATT GCC CA
<i>Mtk-sy-F1</i>	<i>Metchnikowin (Mtk)</i>	CGA TTT TTC TGG CCC TGC T
<i>Mtk-sy-R1</i>	<i>Metchnikowin (Mtk)</i>	CCG GTC TTG GTT GGT TAG GAT
<i>rp49-Real-F1</i>	<i>RpL32 (rp49)</i>	GCT AAG CTG TCG CAC AAA TG
<i>rp49-Real-R1</i>	<i>RpL32 (rp49)</i>	GTT CGA TCC GTA ACC GAT GT

3.1.13 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Quelle
<i>Erwinina carotovora</i> 15	Wildtyp mit Rifampicinresistenz	M. Boutros, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> DH5alpha	<i>Fhu A2 delta(argF-lacZ)U169</i> <i>phoA gln V44 sigma80</i> <i>delta(lacZ)M15 gyrA96 recA1</i> <i>relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Stratagene
<i>One-Shot Top10</i>	<i>F- mcrA .(mrr-hsdRMS-</i> <i>mcrBC) Ö80lacZ.M15.lacx74</i> <i>recA1 araD139.(araleu) 7697</i> <i>galU galK rpsL (StrR) end A1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>Pseudomonas entomophila</i>	Wildtyp mit Rifampicinresistenz und GFP	B. Lemaitre, Zürich
XL10-Gold	<i>TetR Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-</i> <i>hsdSMR-mrr)173 endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 lac Hte [F' proAB</i> <i>lacIqZΔM15 Tn10 (TetR) Amy</i> <i>CamR]</i>	Stratagene, Heidelberg

3.1.14 Fliegenlinien

Name	Genotype	Quelle
<i>caudal-gal4</i>	<i>yw;caudal-gal4/CyO;+</i>	B. Lemaitre, Lausanne
<i>foxo</i> ²¹	<i>yw;+;foxo</i> ²¹ <i>/TM6B,Tb,Hu,e</i>	M. Tatar, Providence
<i>foxo</i> ^{W24}	<i>yw;+;foxo</i> ^{W24} <i>/TM6B,Tb,Hu,e</i>	M. Tatar, Providence
<i>steppke</i> ^{k08110}	<i>yw;P{lacW}l(2)k08110/CyO;+</i>	Bloomington stock 10770
<i>steppke</i> ^{SH032}	<i>yw;P{lacW}l(2)SH0323/CyO;+</i>	Szeged stock FBst0103734
<i>tubulin</i> ^{GS} - <i>gal4</i>	<i>Tubulin-GeneSwitch</i>	M. Jünger, Zürich
<i>UAS-Cecropin A1</i>	<i>yw;UAS-CecA1;+</i>	B. Lemaitre, Lausanne
<i>UAS-Defensin</i>	<i>yw;UAS-Def;+</i>	B. Lemaitre, Lausanne
<i>UAS-Drosocin</i>	<i>yw;UAS-Dro/CyO;+</i>	B. Lemaitre, Lausanne
<i>UAS-Drosomycin</i>	<i>yw;UAS-Drs;+</i>	B. Lemaitre, Lausanne
<i>UAS-foxo</i> ^{WT}	<i>yw;+;UAS-foxo</i> ^{wt}	M. Tatar, Providence
<i>UAS-gfp</i>	<i>yw;+;UAS-gfp</i>	Bloomington stock 4776
<i>UAS-Metchnikowin</i>	<i>yw;UAS-Mtk;+</i>	B. Lemaitre, Lausanne

4 Methoden

Wenn in den folgenden Abschnitten nicht anders beschrieben, wurden alle Arbeiten, Inkubationsschritte und Zentrifugationen bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Plastikwaren verwendet.

4.1 Molekularbiologie

4.1.1 *Isolierung von RNA aus Zellen und Gewebe von Drosophila*

Für die Isolierung von RNA aus Zellen oder Geweben wurde das RNA II Kit (Macherey Nagel) verwendet. Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in 350 µl RA1 Puffer aus dem Kit durch Vortexen lysiert. Für die Lyse von Larven, adulten Fliegen oder deren Gewebe wurden 600 µl RA1 Puffer verwendet. Die Proben wurden in 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäße mit etwa 30 Glasperlen (Roth) transferiert und in einem Precellys-Homogenisator (Peglab) bei 6000 rpm dreimal 10 s aufgeschlossen. Die weitere Isolierung und Reinigung der RNA wurde nach der Anleitung des Herstellers für die Extraktion von RNA aus Geweben durchgeführt, einschließlich dem optionalen Schritt der DNase-Behandlung der Proben. Für die Elution der RNA von der Aufreinigungssäule wurden 40 µl RNase-freies Wasser verwendet. RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

4.1.2 *Bestimmung der Konzentration und der Qualität von RNA*

Konzentration und mögliche Verunreinigungen der isolierten RNA wurden mit einem NanoDrop (Thermo Scientific) und dem vom Hersteller vorgegebenen Programm bestimmt. Dazu wurden 1,5 µl der RNA Lösung auf die Messeinheit des Gerätes gegeben, mit Licht der Wellenlänge 260 nm durchstrahlt und das Absorptionsspektrum ausgewertet. Die so vermessene RNA wurde zur Kontrolle zusätzlich in einer Konzentration von 500 ng auf ein 1,5%iges Agarosegel gegeben und elektrophoretisch aufgetrennt. Zwei prominente,

distinkte Banden stammen von ribosomaler RNA. Eine mögliche Kontamination der Proben mit RNAsen würde zu einer sichtbaren Degradation dieser Banden führen.

4.1.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Für die Transkription von RNA in cDNA wurde das QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen) verwendet. Alle Inkubationsschritte wurden in einem Thermocycler durchgeführt. Je nach Verfügbarkeit wurden 100 ng bis 500 ng gesamt RNA eingesetzt. Um Kontaminationen genomischer DNA zu entfernen, wurde die Proben mit 2 µl DNA wipeout Puffer und RNase-freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 14 µl bei 42 °C 5 min inkubiert. Um später verbliebene Kontaminationen nachzuweisen, wurden 7 µl der Proben als Kontrolle abgenommen und mit 43 µl VE-Wasser aufgefüllt. Zu den restlichen 7 µl der Proben wurden 2 µl Reverse Transcription-Puffer, 0,5 µl Primer-Mix und 0,5 µl des Enzyms Reverse Transcriptase gegeben und durch Vortexen gemischt. Die reverse Transkription wurde bei 42 °C 30 min durchgeführt, das Enzym anschließend durch 3 min Inkubation bei 95 °C inaktiviert. Die Proben wurden mit VE-Wasser auf 50 µl aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

4.1.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA in kleinem und mittlerem Maßstab

Um Plasmide aus *Escherichia coli* DH5alpha für analytische Restriktionsanalysen zu isolieren, wurden 1,5 ml einer 5 ml bakteriellen Übernachtskultur 1 min bei 11.000 rcf zentrifugiert und das Pellet in 200 µl TELT Puffer mit Lysozym in einer Konzentration von 10 mg/ml durch Vortexen gelöst. Die Suspension wurde 5 min inkubiert und anschließend in einem Thermomixer für 3 min auf 97 °C erhitzt. Die Probe wurde dann 5 min auf Eis gekühlt und 15 min bei 11.000 rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde entfernt und der Überstand mit 200 µl Isopropanol durch Vortexen gemischt. Die Plasmid-DNA wurde durch 30 min Zentrifugieren bei 11.000 rcf gefällt und pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl VE-Wasser gelöst.

Für die Isolierung großer Mengen sehr reiner Plasmid DNA für Klonierungen oder Transfektionen wurde das Nucleospin Plasmid AX100 Kit (Macherey Nagel) verwendet. Die Durchführung der Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. DNA wurde immer in VE-Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

4.1.5 Elektrophorese, Aufreinigung und Bestimmung der Konzentration von DNA

Für die Trennung von DNA nach ihrer Größe wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente 1 – 2%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und anschließend auf etwa 60 °C abgekühlt. Zur späteren Detektion von DNA unter UV-Licht wurde der fluoreszierende, DNA-interkalierende Farbstoff SybrSafe (Invitrogen) in einer Konzentration von 1:10.000 hinzugefügt. Die Agarose wurde zu Gelen gegossen, in Laufkammern mit TAE-Puffer gelegt, ein Größenstandard und die DNA zusammen mit einem Ladepuffer aufgetragen. In einem elektrischen Feld wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert.

DNA wurde aus Agarosegelen oder nach enzymatischen Reaktionen mit dem Nucleospin Extract II Kit (Macherey Nagel) aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde nach dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Konzentration und die Qualität von DNA wurden mit einem NanoDrop (Thermo Scientific) bestimmt. Dazu wurden 1,5 µl der Probe auf die Messeinheit des Gerätes pipettiert und das Absorptionsspektrum der Lösung bei 260 nm gemessen.

4.1.6 Isolierung von genomischer DNA

Zur Bestimmung des Genotyps oder zur Gewinnung von DNA-Fragmenten für eine folgende Klonierung wurde genomische DNA aus Fliegen isoliert. Dazu wurden ein bis acht adulte Fliegen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und mit einem Stößel zu Pulver zerrieben. Für die Lyse wurden die Fliegen in 400 µl Puffer A 1 min mit einem Stößel homogenisiert und 30 min bei 65 °C inkubiert. Dann wurden 800 µl

Kac/LiCl Lösung hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die so gefällten Gewebs- und Zelltrümmer wurden bei 11.000 rcf und 4 °C 10 min lang abzentrifugiert. 1 ml des klaren Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Isopropanol durch Pipettieren gemischt und bei 11.000 rcf und 4 °C 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierte DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl VE-Wasser gelöst. Genomische DNA wurde für einige Wochen bei 4 °C, zur Langzeitlagerung bei -20 °C aufbewahrt.

4.1.7 Sequenzierung

Zur Bestimmung des Genotyps von *Drosophila*-Stämmen und zur Überprüfung von Klonierungen wurden DNA-Fragmente sequenziert. Die Proben wurden den Vorgaben der Sequenzierfirmen Seqlab und GATC entsprechend aufgearbeitet und für die Sequenzierung verschickt.

Für die Analyse und Bearbeitung der Sequenzierdaten wurde der Serial Cloner (Serial Basics) verwendet.

4.1.8 Restriktion und Ligation von Plasmiden

Die Restriktion von vektorieller oder linearer DNA wurde mit Endonucleasen (Roche) nach Standardverfahren durchgeführt. 1 µg DNA wurde dabei in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit den entsprechenden Enzymen und passenden Puffern inkubiert. Inkubationszeit und Temperatur waren abhängig vom verwendeten Enzym.

Geschnittene Vektoren wurden mit 1 µl Shrimp alkaline Phosphatase (Roche) 15 min bei 37 °C dephosphoryliert. Das Enzym wurde anschließend bei 70 °C 10 min lang inaktiviert. Nach einer Restriktion wurden Fragmente wie auch Vektoren entweder direkt aufgereinigt oder erst in einer Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und dann aus dem Gel extrahiert. Beides wurde mit dem Nucleospin Extract II Kit (Macherey Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die in einer Probe enthaltene DNA-Menge wurde anhand eines Vergleichs der

Intensität des Signals mit dem Signal eines Standards vergleichbarer Länge in einem Agarosegel abgeschätzt.

Für die Ligation von DNA-Fragment und Vektoren wurde die T4 DNA-Ligase (Roche) verwendet. Der Reaktionsansatz bestand aus 1 µl Ligase und 1 µl 10fach-Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Das Mengenverhältnis von DNA-Fragment zu Vektor betrug etwa 3 : 1. Die Ligation wurde über Nacht bei 14 °C durchgeführt.

4.1.9 TOPO-Klonierung von PCR-Produkten

Es wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) und das vom Hersteller angegebene Standardprotokoll mit halben Volumen verwendet. Um ein DNA-Fragment für die TOPO-Klonierung einsetzen zu können, ist eine 3'Adenin-Überhang für die spätere Ligation mit dem TOPO pCR II-Vektor erforderlich. Diese wurden in einer GoTaq Polymerase-Reaktion angefügt. Dazu wurden 1 µg des DNA-Fragments, 5 µl 5fach GoTaq-Puffer, 1 µl dNTPs und 0,5 µl GoTaq-Polymerase (Promega) gemischt und mit VE-Wasser auf 25 µl Volumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 72 °C inkubiert und anschließend die DNA mit dem Nucleospin Extract Kit II (Macherey Nagel) aufgereinigt.

Nach der Ligation mit dem TOPO pCR II-Vektor wurde 1 µl des Reaktionsansatzes in One Shot TOP10-Bakterien transformiert. LB-Agarplatten wurden mit 50 µl XGal beschichtet und die Bakterien ausgestrichen. Nach Übernachtinkubation bei 37 °C wurden positiv transformierte Klone durch eine blaue Färbung ihrer Kolonien identifiziert.

4.1.10 Herstellung und Transformation von chemokompetenten Bakterien

Bakterien, die Vektoren über Transformation aufnehmen sollen, müssen dafür kompetent sein. Dazu wurden *Escherichia coli DH5alpha* chemisch kompetent gemacht. Mit 1 ml einer ÜN-Vorkultur in LB Medium wurden 100 ml LB Medium einer Hauptkultur angeimpft und bei 37 °C, 220 rpm/min ÜN inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,5 bei Licht einer Wellenlänge von 550 nm, gemessen in einem Photometer, wurden die Bakterien der Kultur bei 1.000 rcf und 4 °C 15 min durch Zentrifugieren pelletiert. Der Überstand wurde

verworfen und die Bakterien in 17 ml vorgekühlter RF-1-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien erneut pelletiert, in 4,5 ml RF-2-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Aliquots dieser Suspension wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Unmittelbar vor der Transformation wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und 100 µl der Suspension mit 100 ng – 500 ng Plasmid DNA durch leichtes Schütteln gemischt. Die Suspension wurde 20 min auf Eis inkubiert, dann 1 min auf 42 °C erhitzt und auf Eis wieder abgekühlt. Bei diesem Hitzeschock nehmen die Bakterien die Plasmid DNA auf. Die Suspension wurde auf 1 ml mit LB-Medium aufgefüllt, 1 h bei 37 °C und 500 rpm im Thermomixer inkubiert. Dann wurden die Bakterien 1 min bei 1.000 rcf pelletiert, der Überstand abgeschüttet und das Pellet im Reflux durch Vortexen suspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert.

4.1.11 Design von Oligonukleotiden

Die Sequenzen der Oligonukleotide (Primer) für PCR-Anwendungen wurden mit dem Serial Cloner (Serialbasics) ausgewählt. Synthetisiert wurden sie von den Firmen Metabion oder Invitrogen. Die Primer wurden entsalzt und in einer Konzentration von 100 pmol/µl bestellt. Für den Einsatz in der quantitativen Real Time PCR müssen Primer ähnliche Eigenschaften besitzen, da sie alle miteinander in einem PCR-Protokoll kombinierbar sein sollen. Die Primerlänge betrug 15-25 bp, die Produktlänge 75-200 bp, die Schmelztemperatur 60 °C – 62 °C und der prozentuale GC-Gehalt 40-60 %.

4.1.12 PCR für Analyse und Klonierung

Für analytische Untersuchungen wurde die GoTaq (Promega) als Polymerase eingesetzt. Sollten die amplifizierten DNA-Fragmente für eine spätere Klonierung eingesetzt werden, wurde die Pfu-Polymerase (Promega) mit Korrekturlesefunktion verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden als Vorlage 100 ng DNA, je 1 µl Primer für beide Leserichtungen und

0,5 µl dNTPs gemischt. Je nach Anwendung wurden 5 µl GoTaq oder 2,5 µl Pfu-Puffer verwendet. Nach Zugabe von 0,125 µl GoTaq oder 0,5 µl Pfu-Polymerase wurde der Reaktionsansatz auf ein Volumen von 25 µl mit VE-Wasser aufgefüllt.

Für die PCRs wurde das folgende Zyklen- und Temperaturprotokoll verwendet. Die Annealingtemperatur wurde den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer, die Elongationszeit der Länge des zu amplifizierenden PCR-Produktes, sowie der Geschwindigkeit der verwendeten Polymerase und die Anzahl der Zyklen der benötigten finalen Produktmenge angepasst.

Zyklen (Anzahl)	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Vorgang
1	95	90	Denaturierung
25 – 40	95	30	Denaturierung
	54 – 68	30	Annealing
	72	30 – 360	Elongation
1	72	600	Elongation

4.1.13 Mutagenese durch PCR

Zur Einführung von Punktmutationen in ein Zielgen auf einem Plasmid wurde das QuickChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach dem Standardprotokoll des Herstellers verwendet. Methylierte Plasmid-DNA wurde aus *E. coli*-Bakterien isoliert und in einer PCR amplifiziert, bei der mehrere Primer mit einer Basenaustausch- oder Deletionsmutation eingesetzt wurden. Zur Verwendung kam eine Pfu-basierte Fusionpolymerase, die in der Lage ist, das Plasmid zu amplifizieren und dabei die mutierten Primer in den neuen DNA-Strang einzubauen. Im nächsten Schritt wurde mit der Endonuclease Dnp I spezifisch die methylierte, ursprüngliche Plasmid-DNA 5 min bei 37 °C verdaut. Die DNA wurde dann durch Hitzeschock in die chemisch kompetenten XL10-Gold Bakterien transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Ampicilinagarplatten ausgestrichen, die Plasmide der Transformanten isoliert und durch Sequenzierung die Mutationen verifiziert.

4.1.14 Quantitative Real Time PCR

Für die quantitative Real Time PCR wurde das iQ5 Real Time PCR Detektionssystem von BioRad eingesetzt. Effizienztests, Schmelzkurvenanalyse und die Auswertung der Experimente nach der delta-delta-CT Methode erfolgte mit der IQ5 Optical System Software von BioRad.

Die Primer für die Real Time PCR wurden wie bereits beschrieben so entworfen, dass ihre optimale Annealing-Temperatur bei 59 °C liegt. Vor ihrem experimentellen Einsatz wurden sie auf ihre Effizienz getestet. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von 1:1 bis 1:625 einer cDNA-Vorlage verwendet. In diesem Bereich mussten die Primer eine Effizienz von mindestens 80 % aufweisen. Die Effizienz wurde bei der Berechnung der Expression von der Software berücksichtigt. Um die Bildung von Primerdimeren auszuschließen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Primer, die Dimere bilden, wurden für Experimente nicht weiter berücksichtigt.

Jede Probe wurde in Duplikaten oder Triplikaten auf 96 well-Platten pipettiert. Die verwendete cDNA wurde wie bereits beschrieben aus isolierter Gesamt-RNA hergestellt. In Mastermixen wurden cDNA mit VE-Wasser und die Primer mit SYBRGreen Supermix angesetzt und dann untereinander zu Reaktionsansätzen kombiniert. Pro 25 µl Gesamtvolumen eines Ansatzes wurden 1 µl cDNA, je Leserichtung 0,5 µl Primer, 12,5 µl SYBRGreen Supermix (BioRad) und 10,5 µl VE-Wasser eingesetzt.

Es wurde das folgende Temperatur- und Zyklenprotokoll verwendet:

Zyklen (Anzahl)	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Vorgang
1	95	300	Aktivierung der Polymerase
40 - 45	95	30	Denaturierung
	59	30	Annealing
	72	30	Elongation
80	55 auf 95 (+0,5 pro Zyklus)	30	Schmelzkurve (optional)

Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen *rp49* verwendet, das unter den experimentellen Bedingungen transkriptionell nicht reguliert war. Im Ergebnisteil dieser Arbeit werden die Expressionsdaten immer relativ zu einer experimentellen Kontrolle dargestellt, deren Expressionslevel auf den Wert 1 gesetzt wurde. Wenn es nicht anders beschrieben ist, wird immer die Kombination aus mindestens zwei biologisch unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Expressionslevel stellen dann deren Mittelwert und die Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dar. Die entsprechenden Analysen wurden in Excel (Microsoft) durchgeführt und mit einem Student's t-Test beurteilt. n- und p-Werte, sowie Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

4.2 Mikrobiologie

4.2.1 Kultivierung von Bakterien

Alle Bakterienstämme wurden bei -80 °C in 50 % Glycerol gelagert. Die noch gefrorenen Bakterien wurden mit einer Impföse abgekratzt und auf einer LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und ÜN bei der jeweils optimalen Temperatur inkubiert. Die Platten wurden maximal zwei Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

4.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) wurden auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm ÜN inkubiert.

4.2.3 *Pseudomonas entomophila*

Die hier verwendeten *Pseudomonas entomophila* (*P. entomophila*) tragen auf einem Plasmid eine Rifampicinresistenz. Sie wurden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Rifampicin ausgestrichen und 24 h bei 29 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin für 18 h bei 29 °C und 220 rpm inkubiert. Diese großen Kulturen

wurden mit Vorkulturen angeimpft. Da *P. entomophila*-Bakterien in Kultur ein Plasmid mit wichtigen Virulenzfaktoren verlieren können, wurden sie auf die Anwesenheit dieses Plasmids selektiert. Für die Selektion wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Rifampicin und 3 % Milchpulver ausgestrichen. Kolonien, die einen klaren Hof bildeten, wurden weiter kultiviert.

4.2.4 *Erwinia carotovora* 15

Erwinia carotovora 15 (*E. carotovora* 15) trägt ein Plasmid mit einer Rifampicinresistenz. Sie wurden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Rifampicin ausgestrichen und ÜN bei 29 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin ÜN bei 29 °C und 220 rpm inkubiert.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Drosophila Schneider-Zellen (S2-Zellen, Invitrogen) wurden in 250 ml Zellkulturflaschen in Schneiders Medium (Invitrogen), 10 % FCS (Biowest) und 1 % Penicilin/Streptomycin bei 25 °C inkubiert. Sie wurden zweimal in der Woche, wenn die Zellen zu etwa 90 % konfluent waren, passagiert und dabei im Verhältnis 1 : 3 verdünnt. Nach etwa 25 Passagen wurden sie durch neue Zellen ersetzt.

Für Experimente wurden die S2-Zellen in 24 Well-Platten mit $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well ausgesät. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und frisches Medium in die Flasche gegeben. Die adhärenenten Zellen wurden durch Klopfen gelöst, ihre Anzahl mit einer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt und mit Medium wurde die gewünschte Konzentration eingestellt. Anschließend wurden die Zellen auf die Platten ausgesät und 2 h lang inkubiert, um sie wieder adhären zu lassen.

4.3.2 Analyse der Luciferase-Expression

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und 1 ml frisches Medium ohne FCS pro Well hinzugefügt. Für jeden Transfektionsansatz wurden 100 µl Schneiders Medium, 10 µl Cellfectin (Invitrogen) und 1,5 µg je Plasmid durch leichtes Vortexen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend wurden die Proben 30 min inkubiert und zu den Zellen gegeben, die nun 5 h bei gelegentlichem Schwenken der Platte inkubiert wurden. Das Transfektionsmedium wurde entfernt und durch frisches Medium mit FCS und Antibiotika ersetzt. Es wurden Plasmide mit Methallothioninpromotoren eingesetzt, deren Expression durch die Inkubation mit 0,5 mM CuSO₄ 24 h lang induziert wurde. Die transkriptionelle Regulation der *Luciferase* wurde in einer quantitativen Real Time PCR gemessen.

4.3.3 Secin-Behandlung und Stimulation mit Insulin

S2-Zellen wurden 6 h in Schneiders Medium ohne FCS bei 25 °C inkubiert, um einen Hungerzustand zu induzieren. Dann wurden sie 16 h mit einer bisher unbeschriebenen Secinverbindung oder als Referenz mit SecinH3, jeweils in einer Konzentration von 10 µM behandelt. Alle Secinverbindungen wurden in DMSO gelöst und bei RT aufbewahrt. Die Endkonzentration von DMSO im Medium der Versuchsansätze und der Kontrollen betrug 0,5 %. Es folgte für die Dauer von 2 h eine Stimulation mit 5 µg/ml Insulin (Sigma). Kontrollen wurden mit und ohne Secin sowie mit und ohne Insulinstimulation durchgeführt.

Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert, durch reverse Transkription cDNA hergestellt und mit einer quantitativen Real Time PCR die transkriptionelle Regulierung von *4E-BP* analysiert.

4.4 *Drosophila melanogaster*

4.4.1 Haltung und Kreuzung

Drosophila melanogaster-Stämme (*Drosophila*) wurden auf Standardfutter bei 18 °C gehalten. Sie waren entweder homozygot oder trugen chromosom-spezifische Balancer, die

eine Rekombination verhinderten. Bei Kreuzungen wurden unbefruchtete Weibchen eines Stammes mit jungen Männchen eines anderen Stammes in einem Fliegenröhrchen mit Standardfutter zusammengebracht. Wenn nicht anderes angegeben, wurden Kreuzungen von Fliegen und Experimente bei 25 °C in Inkubatoren durchgeführt.

4.4.2 GAL4/UAS-System

Das GAL4/UAS-System (Elliott und Brand, 2008; Phelps und Brand, 1998) wurde eingesetzt, um Proteine in definierten Geweben von *Drosophila* zu exprimieren. Dazu wurden Fliegen mit einem gewebespezifischen Promotor und anschließender *gal4*-Sequenz mit Fliegen gekreuzt, welche eine UAS und die Sequenz des Zielgens trugen. In den Nachkommen dieser Kreuzung bindet das GAL4-Protein in den Geweben, in denen es exprimiert wird, an die UAS und induziert so die Expression des Zielgens.

4.4.3 GAL4/UAS GeneSwitch System

Sollte die Expression eines Proteins nicht nur gewebespezifisch, sondern auch noch zeitlich frei definierbar sein, wurde das GAL4/UAS GeneSwitch System (GS) (Osterwalder et al., 2001; Roman et al., 2001) eingesetzt. Das hier exprimierte, modifizierte GAL4 ist erst dann in der Lage, an die UAS zu binden und die Transkription des Zielgens zu induzieren, wenn es mit dem Progesteron-Rezeptorantagonisten Mifepriston (Sigma) interagiert. Es ist innerhalb von wenigen Stunden nach der Aufnahme wirksam. Zusätzlich zur zeitlichen Steuerung der Induktion des Systems kann durch die Wahl der Konzentration des eingesetzten Mifepristons auch der Transkriptionslevel des Zielgens reguliert werden. Mifepriston wurde in Ethanol gelöst und dem Fliegenfutter in Konzentrationen von 1 – 10 µg/ml bei einer Temperatur von 60 °C zugegeben.

4.4.4 Fütterung mit chemischen Inhibitoren und Antibiotika

Bei den Überlebensexperimenten wurden dem Fliegenfutter niedermolekulare Verbindungen der Secin-Klasse und Antibiotika zugesetzt. Die Zugabe erfolgte während der Herstellung des Langlebigkeitsfutters bei einer Temperatur von 60 °C. Die verwendete Konzentration von Secin betrug zwischen 1 und 90 µM/ml, die Konzentration der Antibiotika betrug 500 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Tetracyclin und 200 µg/ml Rifampicin. Secin wurde in DMSO, die Mischung der Antibiotika in Ethanol gelöst.

4.4.5 Messung der Nahrungsaufnahme mit dem CAFE-Assay

Um die Menge der aufgenommenen Nahrungsmenge von adulten Fliegen zu messen, wurde der CAFE-Assay durchgeführt (Ja et al., 2007). Damit wurde die Nahrungsaufnahme von verschiedenen *Drosophila*-Stämmen oder die Auswirkung durch Zusätze in der Nahrung, wie z.B. Secin, gemessen. Ein 50 ml Falcon wurde als feuchte Kammer mit 5 ml Wasser befüllt und bildete den Abschluss des geschlossenen Systems. Ein leeres Fliegenröhrchen mit zwei weiblichen Fliegen (Gruppe) wurde mit Belüftungslöchern versehen und luftdicht mit dem Deckel des Falcon verbunden. In den Deckel des Falcons wurde ein Loch gestoßen und eine Pipettenspitze hinein gesteckt. Die Nahrung wurden den Fliegen über eine 0,5 µM dicke Kapillare zugeführt, die durch die Pipettenspitze in das Fliegenröhrchen ragte. In die Kapillare wurde zuerst etwas Öl als Verdunstungssperre und dann eine 5 %ige Lösung von Saccharose in PBS gesaugt, die auch zu testende Zusätze, wie z.B. Secin, enthalten konnte. Die Höhe der Lösungssäule in der Kapillare wurde bei der Einführung in das System und bei der Entnahme gemessen und aus der Differenz der beiden Zeitpunkte und aus der Verdunstungskontrolle die Nahrungsaufnahme pro Fliege in nl/h berechnet. Die Messung wurde täglich in einem Messzeitraum von 10 Tagen ausgeführt. Die ersten drei Tage dienten der Gewöhnung der Fliegen an den experimentellen Aufbau sowie an die neuartige Nahrungszufuhr und wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Pro experimenteller Bedingung wurden immer mindestens fünf Gruppen untersucht und pro Experiment zwei Verdunstungskontrollen ohne Fliegen eingesetzt. Die statistischen Analysen wurden in Excel

(Microsoft) durchgeführt und mit einem Student's t-Test beurteilt. n- und p-Werte sowie Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

4.4.6 Überlebensexperimente in *Drosophila*

Kreuzungen von Fliegen für anschließende Untersuchungen zur Lebensspanne der Nachkommen durch Überlebensexperimente wurden auf Standardfutter angesetzt. Die Nachkommen der Elterntiere wurden jeden Tag abgesammelt und zur Paarung in frische Fliegenröhrchen mit Standardfutter gesetzt. Nach zwei Tagen wurden die Weibchen unter CO₂-Betäubung gesammelt und in Gruppen von 22 Tieren auf Langlebigkeitsfutter gesetzt. Für ein Experiment wurden mindestens 5, in der Regel 10 Gruppen pro Bedingung eingesetzt. Für die folgende Untersuchung zur Überlebenszeit wurden die Fliegen in Inkubatoren mit einem 12stündigen Tag-Nachtzyklus bei 25 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle zwei bis drei Tage wurden die Fliegen auf frisches Futter überführt und dabei die toten Tiere entfernt. Die Anzahl der gestorbenen Tiere wurde täglich notiert. Entnommene, entwichene und versehentlich getötete Fliegen wurden ebenfalls notiert und in der Auswertung zensiert. Das Futter wurde bei 4 °C aufbewahrt und maximal zwei Wochen verwendet.

4.4.7 Analyse der Überlebensexperimente

Wenn es nicht anders beschrieben ist, wurden für die Experimente immer weibliche adulte *Drosophila* eingesetzt. Für die Analyse der Überlebenszeit verschiedener *Drosophila*-Stämme oder des gleichen Stammes bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen wurde die Methode nach Kaplan-Meier verwendet. Dabei wurden Überlebenskurven erstellt, welche die Überlebenswahrscheinlichkeit (Überleben) einer Gruppe gegen die Zeit darstellen. Für die Bewertung des Vergleichs von Überlebenswahrscheinlichkeiten wurde der Log-Rang-Test verwendet. Außerdem wurde die mittlere Überlebenszeit berechnet, also der Zeitpunkt, zu dem die Hälfte der Gruppe gestorben ist. Die relative mittlere Überlebenszeit biologisch unabhängiger Experimente wurde kombiniert und mit einem einseitigen Student's t-Test für

Proben mit ungleicher Varianz analysiert. Die Ergebnisse wurden in Boxplots dargestellt, wobei der Median das untere und das obere Quartil trennt und das Kreuz den Mittelwert markiert. Die T-förmigen Whisker stellen den 1,5fachen Interquartil-Abstand dar, Werte ausserhalb der Whisker werden durch Punkte gekennzeichnet und stellen Ausreißer dar. Die Berechnungen wurden mit Excel und XLSTAT (Microsoft) durchgeführt. Alle n- und p-Werte sowie die Zensurdaten sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt.

4.4.8 Natürliche Infektion von adulten Fliegen

Für natürliche, orale Infektionen wurde entweder *P. entomophila* oder *E. carorovora* 15 verwendet. ÜN-Kulturen der Bakterien wurden bei 4 °C und 1.000 rcf 15 min pelletiert. Die Pellets wurden im Verhältnis 1 : 4 mit einer 10 %igen Saccharose-Lösung in PBS homogenisiert. 500 µl dieser Bakterienlösung wurden dann auf Faltenfilter in leeren Fliegenröhrchen pipettiert. Als feuchte Kammer für diese Fliegenröhrchen dienten 50 ml Falcons, befüllt mit 5 ml Wasser. In jedes Fliegenröhrchen wurden 10 weibliche befruchtete *Drosophila*-Fliegen im Alter von 14 Tagen gesetzt. Die Tiere wurden 4 h lang bei 25 °C auf den Bakterienlösungen gehalten.

4.4.9 Analyse der bakteriellen Belastung des Darms nach natürlicher Infektion

Infizierte Fliegen wurden mit CO₂ betäubt, 1 min lang in 70%igem Ethanol äußerlich desinfiziert und auf Filterpapier getrocknet. Anschließend wurden die Fliegen einzeln in 2 ml Schraubdeckelgefäße mit 1 ml MgSO₄ und Glaskugeln (Roth) überführt und 10 s bei 5.000 rpm in einem Precellys-Homogenisator (Peqlab) homogenisiert. Diese Homogenate mit den freigesetzten Bakterien wurden in zwei Schritten 1 : 10.000 verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden auf LB-Rifampicin-Agarplatten ausgestrichen und 18 h bei 29 °C inkubiert. Die Kolonien wurden gezählt und die durchschnittliche bakterielle Belastung des Darms durch das Pathogen wurde berechnet. Die relativen Mittelwerte von mehreren Experimenten wurden kombiniert, mit einem einseitigen Student's t-Test für Proben mit ungleicher Varianz analysiert und in Boxplots (Beschreibung siehe Kapitel 4.3.11) dargestellt.

n- und p-Werte, sowie Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

4.4.10 Gewebepräparation

Für die Präparation von Geweben aus adulten *Drosophila* wurden die Fliegen mit CO₂ betäubt und auf einem Objektträger in PBS mit Pinzetten präpariert. Bei der Entnahme des Verdauungssystems wurden Kopf und Thorax auseinander gezogen. Der Mitteldarm wurde anterior des Proventrikulus abgetrennt und der Rest des Darms aus Thorax und Abdomen gezogen. Der Enddarm und alle anhängenden Organe wurden entfernt. Zur Verwendung in der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gewebe wie in Kapitel 4.3.15 beschrieben behandelt. Sollte die RNA isoliert werden, wurden 10 Därme pro experimenteller Bedingung präpariert, in RA 1-Puffer mit β -Mercaptoethanol (Macherey Nagel) gesammelt und wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben weiter verarbeitet.

4.4.11 Immunofluoreszenzfärbung

Fixierung und Färbung von präparierten Geweben adulter Fliegen fanden in einem 1,5 µl Reaktionsgefäß statt. Alle folgenden Schritte wurden auf einem Drehrad durchgeführt. Zuerst wurden die Gewebe auf Eis in PBT mit einem Tween-Anteil von 0,5 % gesammelt, 4 % Formaldehyd hinzugefügt und 20 min fixiert. Die Fixierlösung wurde anschließend 2 x 5 min, 2 x 15 min, 2 x 30 min und 1 x 60 min durch Austausch mit PBT vom Gewebe gewaschen. Anschließend wurde mit PBT und 5 % Ziegenerum 60 min blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (rabbit anti-GFP, Verdünnung 1:1.000) wurde in frischer Blockierlösung über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe 2 x 5 min, 2 x 15 min, 2 x 30 min und 1 x 60 min in PBT mit einem Tweenanteil von 0,1 % gewaschen. Dann wurden die Proben in PBT und 5 % Ziegenerum mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit Alexa 488, Verdünnung 1:200) und Phalloidin-Alex 565 (1:100.000) 60 min im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung wurde durch 2 x 5 min, 2 x 15 min und 1 x 30 min Waschen im Dunkeln mit PBT entfernt. Anschließend wurden die Gewebe für die spätere fluoreszenz-mikroskopische

Analyse konserviert. Dazu wurden sie auf einem Objektträger in dem Kunstharz Mowiol mit DAPI vereinzelt und luftblasenfrei unter einem Deckglas eingedeckelt. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden das LSM 780 (Zeiss) verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Direkte Regulation von *Drosomycin* durch FOXO

5.1.1 Klonierung und Mutagenese des *Drosomycin*-Promotors

In *Drosophila*-Larven ist *Drosomycin* das am stärksten FOXO-abhängig regulierte AMP. In der Promotorregion des Gens wurde ein Cluster mit zwei FOXO- und drei Forkhead-Bindemotiven indentifiziert (Becker et al., 2010). Eine dieses Cluster umfassende, 2 kb lange Region stromaufwärts des *Drosomycin*-Transkripts wurde als Promotor definiert. Um die direkte Abhängigkeit der FOXO-Regulation von *Drosomycin* von den identifizierten Bindestellen zu zeigen, wurden unterschiedlich mutierte Varianten des Promotors in ein *pGL3-Luciferase*-Reporterplasmid kloniert. Das wildtypische Konstrukt Drs-WT und das Deletionskonstrukt Drs-1-5 (Abb. 9), bei dem alle fünf FOXO-Bindemotive fehlten, standen vor dieser Arbeit bereits zur Verfügung. Bei dem Deletionskonstrukt fehlte die Sequenz des Promotors zwischen Position -1084 und -608. Auf Basis des wildtypischen Konstrukts Drs-WT wurden vier weitere Konstrukte hergestellt, bei denen ein einzelnes oder eine Kombination von mehreren Motiven mutiert waren, nämlich die Konstrukte Drs-1, Drs-12, Drs-13, Drs-1345 (Abb. 9), deren Mutationen mit dem QuickChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit zuvor erzeugt worden waren. Bei der Mutation der FOXO-Bindestelle an Position -990 wurden zwei Basen deletiert, bei den Mutationen der anderen Bindestellen wurden einzelne Basen ausgetauscht. Die Übersicht in Abbildung 10 stellt die Konstrukte mit ihren mutierten Bindemotiven dar.

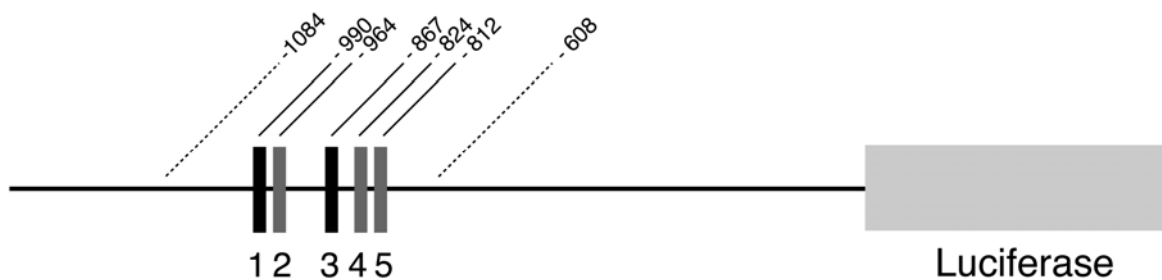


Abbildung 9 Schematische Darstellung der *Drosomycin*-Promotor-Konstrukte. Markiert sind die Positionen der FOXO-Bindemotive (schwarz), der Forkhead-Bindemotive (dunkel grau) und des Luciferase-Reportergens (hell grau). Mit gestrichelten Linien ist der Deletionsbereich des Drs-1-5-Konstrukts gekennzeichnet.

Bezeichnung	Motivposition -990	Motivposition -964	Motivposition -867	Motivposition -824	Motivposition -812
Drs-WT	GTAAACAA	TGTTTAT	TTGTTTAC	TTGTTTAT	TTGTTTAT
Drs-1	GT -- AGGA	TGTTTAT	TTGTTTAC	TTGTTTAT	TTGTTTAT
Drs-12	GT -- AGGA	TCITTAT	TTGTTTAC	TTGTTTAT	TTGTTTAT
Drs-13	GT -- AGGA	TGTTTAT	TCCTTTAC	TTGTTTAT	TTGTTTAT
Drs-1345	GT -- AGGA	TGTTTAT	TCCTTTAC	TTCTTTAT	TTCTTTAT

Abbildung 10 Mutation der FOXO- und Forkhead-Binde-Motive. Die veränderten Sequenzen der Mutations-Konstrukte sind grau hinterlegt.

5.1.2 Transkriptionsanalysen mit Deletionskonstrukten in S2-Zellen

Um zu zeigen, dass die Aktivierung der Expression von *Drosomycin* durch FOXO von dem FOXO/Forkhead-Bindemotivkluster im Promotor des Gens abhängig ist, wurden das wildtypische Konstrukt *pGL3-Drs-WT* (*Drs-WT*) und das Deletionskonstrukt *pGL3-Drs-1-5* (*Drs-1-5*) in *Drosophila* S2-Zellen getestet. Je eines der Konstrukte wurde mit den beiden Plasmiden *pMT-GAL4* und *pUAS-foxo-gfp* co-transfiziert. Über den Metallothionein-Promotor des pMT-Plasmids wurde die Expression von *GAL4* durch Inkubation mit CuSO_4 induziert. Das *GAL4*-Protein wiederum induzierte über die Bindung an die UAS die Expression des Fusionproteins FOXO-GFP (Fuss et al., 2006). Die Transkriptionsinduktion von FOXO über den *Drosomycin*-Promotor wurde durch die Messung der Transkriptmenge des *Luciferase*-Gens in einer quantitativen Real Time PCR bestimmt. Da nur ein geringer Anteil der S2-Zellen transfiziert war, konnte zur Normalisierung der Messung kein Referenzgen aus dem Genom der S2-Zellen verwendet werden. Um die Expression in Abhängigkeit des exprimierten FOXO-Proteins darzustellen, wurden deshalb die Expressionslevel der *Luciferase* gegen die Transkriptmenge von *foxo-gfp* normalisiert. Um ein Hintergrundsignal von wildtypischer *foxo*-Expression auszuschließen wurden *gfp*-spezifische Primer für die Messung verwendet.

Nach Induktion der *foxo-gfp*-Expression war eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge von *Luciferase* bei Vergleich des *pGL3-Drs-WT*-Plasmids mit dem Hintergrundsignal des leeren Kontroll-*pGL3*-Plasmids zu erkennen (Abb. 11). Im Vergleich des *pGL3-Drs-1-5*-Plasmids mit der Kontrolle konnte kein Expressionsunterschied detektiert werden (Daten

nicht gezeigt). Der FOXO/Forkhead-Bindemotivcluster ist wesentlich für die Fähigkeit von FOXO ist die Transkription über den *Drosomycin*-Promotor zu induzieren.

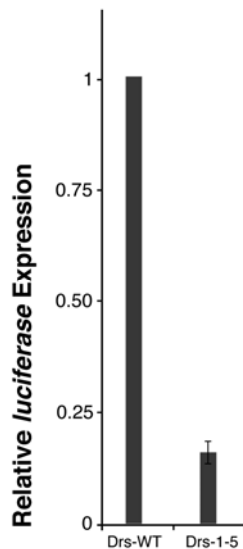


Abbildung 11 FOXO-abhängige Transkription von *Drosomycin*. Expressionlevel des Luciferase-Reporters nach Aktivierung des *Drosomycin*-Promotors durch FOXO-GFP Induktion in S2-Zellen. Vergleich zwischen dem wildtypischen Konstrukt (Drs-WT) und dem Deletions-Konstrukt (Drs-1-5). Die Abbildung zeigt die Kombination von zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

5.1.3 Transkriptionsanalysen mit Mutationskonstrukten in S2-Zellen

Wie bereits gezeigt, ist der FOXO/Forkhead-Bindemotivcluster essentiell für die Induktion der Transkription über den Promotor von *Drosomycin*. Bei dem Konstrukt *Drs-1-5* ist eine Sequenz mit der Länge von 476 Basen deletiert. Um nachzuweisen, dass ausschließlich die FOXO/Forkhead-Bindemotive und keine weiteren, bisher nicht identifizierten regulatorischen Sequenzen im Bereich der Deletion relevant für die FOXO-Induktion sind, wurden auch die Punktmutationskonstrukte im Luciferase-Assay getestet (Abb. 12). Schon die einzelne Mutation des FOXO-Bindemotivs an Position -990 führte zu einer Reduktion der *Luciferase*-Transkription auf etwa 25 %. Durch die zusätzliche Mutation des Bindemotivs an Position -964 oder -867 war keine weitere Reduzierung der Transkriptlevel zu erreichen. Der Level reduzierte sich aber noch einmal um die Hälfte, wenn die Bindemotive an den vier Positionen -990, -867, -824 und -812 mutiert waren (Abb. 12). Die Transkriptmenge ließ sich damit im Vergleich zum wildtypischen Konstrukt ähnlich reduzieren, wie das mit dem

Deletionskonstrukt gelang (Abb. 11). Das FOXO/Forkhead-Bindemotivcluster im *Drosomycin*-Promotor ist also ausreichend und notwendig, um eine FOXO-abhängige Transkription zu induzieren.

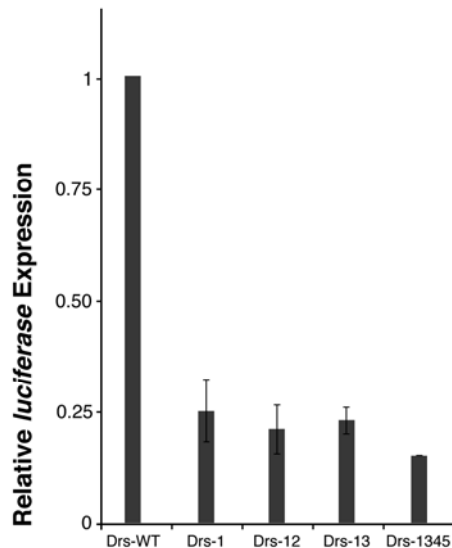


Abbildung 12 Abhängigkeit der *Drosomycin*-Expression von FOXO/Forkhead-Bindemotiven. Expressionlevel des Luciferase-Reporters nach Aktivierung des *Drosomycin*-Promotors durch FOXO-GFP-Induktion in S2-Zellen. Vergleich zwischen dem wildtypischen Konstrukt (Drs-WT) und verschiedenen mutierten Konstrukten (Drs-1, Drs-12, Drs-13, Drs-1345). Die Abbildung zeigt die Kombination von zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Die Experimente in Kapitel 5.1 wurden in Kooperation mit anderen Personen durchgeführt. Die Klonierung wurde zusammen mit Thomas Becker und Anna Aschenbrenner durchgeführt, die Transkriptionsanalysen wurden mit Thomas Becker ausgewertet. Die Ergebnisse sind gemeinsam veröffentlicht (Becker et al., 2010).

5.2 IIS-abhängige Regulation der Lebensspanne über Steppke

5.2.1 Überlebensexperimente mit steppke-Mutanten

2006 wurde das Protein Steppke erstmals als Komponente des IIS beschrieben (Fuss et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass Steppke für die Regulation des larvalen Größenwachstums benötigt wird. Auch Chico, eine weitere Komponente des IIS, ist ein Regulator dieses Größenwachstums (Bohni et al., 1999). Für Chico wurde außerdem ein Einfluss auf die Regulation der Lebensspanne der adulten Fruchtfliege beschrieben (Clancy et al., 2001). Um

zu überprüfen, ob auch *Steppke* eine solche Funktion hat, wurde ein Überlebensexperiment mit transheterozygoten *steppke*^{K/SH}-Mutanten durchgeführt, bei denen die *steppke*-Transkriptmenge auf 10 % gegenüber wildtypischen Tieren reduziert ist (Fuss et al., 2006). Die beiden Allele *steppke*^{k08110} und *steppke*^{SH0323} wurden durch Kreuzung der beiden Linien kombiniert. Die Linien wurden vorher durch achtfache Rückkreuzung mit der *w*¹¹¹⁸-Kontrolllinie isogenisiert (durchgeführt von Ingo Zinke). Für diese und alle weiteren Überlebensexperimente wurden weibliche adulte *Drosophila* in Gruppen von 22 Fliegen verwendet. Die Auswertung der Experimente wurde mit der Kaplan-Meier-Methode vorgenommen und die Signifikanz der Differenzen der mittleren Überlebenszeit mit einem Student's t-Test bewertet.

Es wurden zwei biologisch unabhängige Experimente durchgeführt. In beiden Fällen war die Lebensspanne der transheterozygoten *steppke*^{K/SH}-Mutanten gegenüber der *w*¹¹¹⁸-Kontrolle signifikant verlängert (Abb. 13 a und b). Kombiniert ergab sich eine signifikante Erhöhung der relativen mittleren Überlebenszeit von 20 % (Abb. 13 c).

Die aufgenommene Nahrungsmenge eines Organismus hat, vor allem über die daraus resultierende Regulation des IIS, einen Einfluss auf seine Lebenserwartung. Eine Reduzierung der zugeführten Nahrung, insbesondere von Proteinen, kann zu einer Verlängerung der Lebensspanne von *Drosophila* führen (Fontana et al., 2010; Strauss, 2001). Um den Effekt einer Lebensverlängerung durch eine reduzierte Nahrungsaufnahme der *steppke*^{K/SH}-Mutante gegenüber den *w*¹¹¹⁸-Fliegen auszuschließen, wurde in einem CAFE-Assay die Nahrungsaufnahme der beiden Fliegenlinien pro Stunde ermittelt. Ein positiver Einfluss auf die Lebensspanne der *steppke*^{K/SH}-Mutante konnte damit ausgeschlossen werden, da die Nahrungsaufnahme der Mutante gegenüber der *w*¹¹¹⁸-Kontrolle sogar signifikant höher war (Abb. 13 d).

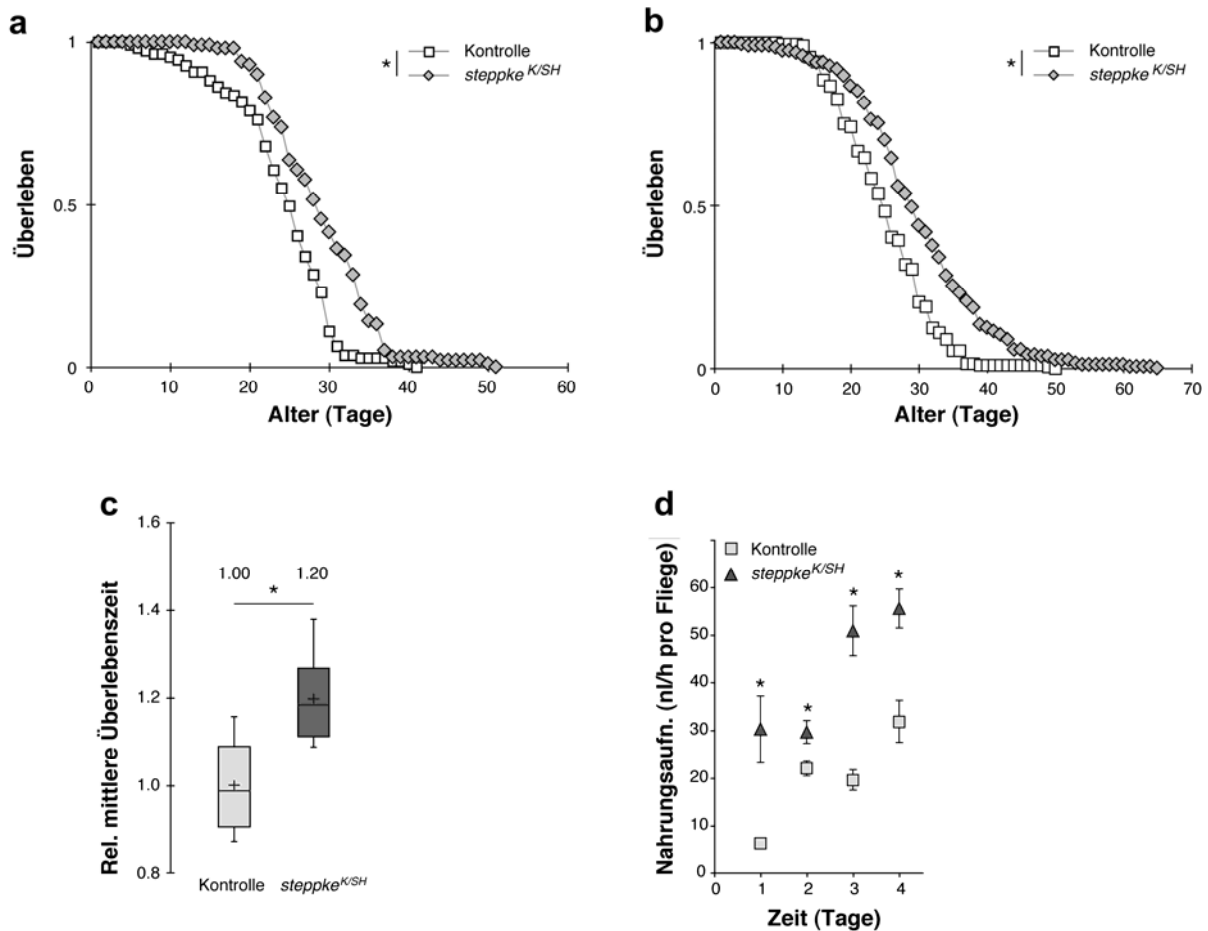


Abbildung 13 Die IIS-Mutante *steppke*^{K/SH} hat eine verlängerte Lebensspanne. (a und b) Überlebensexperimente mit *steppke*^{K/SH}-Mutanten im Vergleich zu isogenen *w*¹¹¹⁸-Kontrollen. (c) Relative mittlere Überlebenszeit der beiden kombinierten unabhängigen Experimente. (D) Messung der Nahrungsaufnahme der *steppke*^{K/SH}-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen mit einem CAFE-Assay. Die Werte in (c) sind Mittelwerte, die Fehlerbalken in (d) repräsentieren den SEM. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n-, p- und SEM-Werte sind in den Tabellen 1, 2 und 5 angegeben.

5.2.2 Der Steppke-Inhibitor SecinH3

Der chemische Inhibitor SecinH3 bindet spezifisch an die Sec7-Protein-Protein-Interaktionsdomäne von Mitgliedern der Cytohesin-GEF-Familie in Mäusen und Menschen (Hafner et al., 2006). In *Drosophila* wurde ein Mitglied dieser Proteinfamilie als essentielle Komponente des IIS identifiziert (Fuss et al., 2006). Das Gen wurde aufgrund der auch für andere IIS-Mutanten typischen, reduzierten Körpergröße im larvalen und adulten Stadium *steppke* genannt. Nach Aufnahme durch die Nahrung inaktiviert SecinH3 die Funktion von Steppke und reduziert so die Aktivität des IIS. Damit induziert diese chemische Inhibition der Kaskade die gleichen phänotypischen Veränderungen, die auch durch die genetische

Manipulation des Signalwegs oder eine stark reduzierte Nahrungszufuhr erzeugt werden. Dies sind in Larven z.B. reduziertes Größenwachstum oder die Induktion von FOXO-Zielgenen, wie *4E-BP* oder AMPs (Becker et al., 2010; Fuss et al., 2006). In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass eine Mutation des *steppke*-Gens zu einer Verlängerung der Lebensspanne von adulten Fliegen führt (Abb. 13). Die Erzeugung eines solchen Effekts durch eine Verbindung, die durch die Nahrung aufgenommen werden kann, bedeutet nicht nur die wesentliche Erweiterung der Möglichkeiten, den Mechanismus des IIS zu untersuchen, sondern – bei Übertragung auf den Menschen – die Entwicklung eines Wirkstoffs zur Verlängerung des Lebens zu betreiben.

Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit Überlebensexperimente durchgeführt, um die Wirkung von SecinH3 zu testen. Wenn nicht anders angegeben, ist der Stamm *w¹¹¹⁸* verwendet worden. Die Überlebensexperimente wurden mit der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet und die Signifikanz der Differenzen der mittleren Überlebenszeit wurde mit einem Student's t-Test bewertet.

5.2.3 Überlebensexperimente mit dem *Steppke*-Inhibitor SecinH3

SecinH3 ist nicht wasserlöslich und damit schwer in die Nahrung von Fliegen einzubringen. Als Lösungsmittel wurde DMSO verwendet, das in den folgenden Experimenten auch den Kontrollgruppen in die Nahrung gegeben wurde. Die Verabreichung von SecinH3 erfolgte über die gesamte Lebensspanne der adulten Tiere bei gleicher Konzentration. Die geringste Konzentration SecinH3 in der Nahrung, die über mehrere Experimente eine stabile signifikante Verlängerung der Lebensspanne erzeugte, betrug 10 μ M (Abb. 14 a-c). Abbildung 14 d zeigt die Kombination der relativen mittleren Überlebenszeit von drei biologisch unabhängigen Experimenten. Die relative mittlere Überlebenszeit der mit SecinH3 gefütterten Fliegen gegenüber den Kontrollen ist um 7 % signifikant höher.

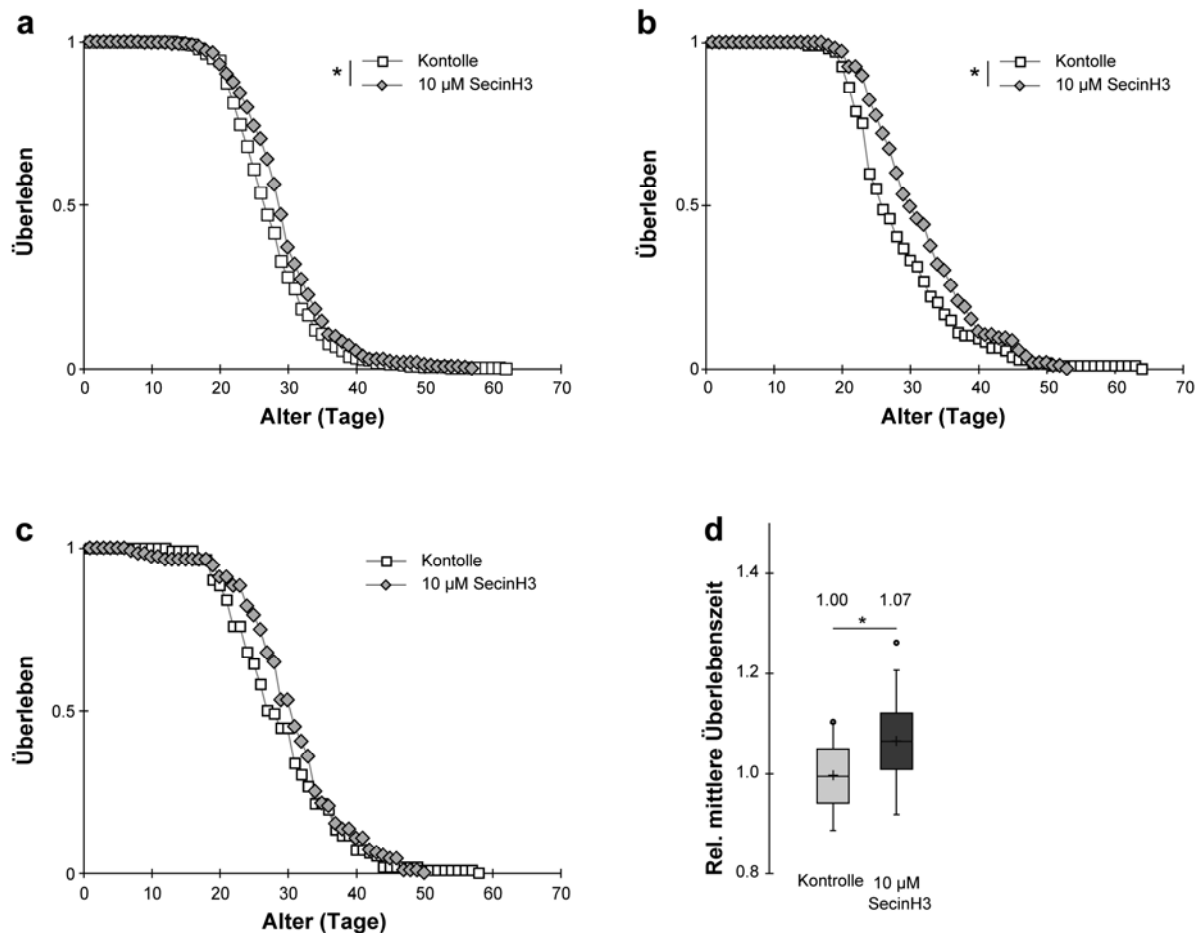


Abbildung 14 Der Steppke-Inhibitor SecinH3 verlängert die Lebensspanne von *Drosophila*. (a-c) Überlebensexperimente mit *w¹¹¹⁸*-Fliegen, gefüttert mit 10 µM SecinH3, im Vergleich zu Fliegen auf Kontrollfutter. (d) Relative mittlere Überlebenszeit von vier kombinierten unabhängigen Experimenten. Die Werte in (d) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n - und p -Werte sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

Die relative mittlere Überlebenszeit von *steppke^{K/SH}*-Mutanten gegenüber isogenen *w¹¹¹⁸*-Kontrollen war dagegen um 20 % höher (Abb. 13). Bei dieser Mutante ist die Expression von *steppke* reduziert, aber nicht vollständig blockiert (Fuss et al., 2006). Dass eine zusätzlich Reduktion der Steppke-Aktivität durch SecinH3 in *steppke^{K/SH}*-Mutanten zu einer weiteren signifikanten Verlängerung der Lebensspanne führt, wurde in zwei weiteren Überlebensexperimenten gezeigt (15 a und b). Die relative mittlere Überlebenszeit der mit 10 µM SecinH3 gefütterten Fliegen gegenüber den *steppke^{K/SH}*-Kontrollen war um 17 % und damit signifikant höher, im Vergleich mit den isogenen *w¹¹¹⁸*-Kontrollen sogar um 37 % (Abb. 15 c).

Die chemische Manipulation von Steppke durch den Inhibitor SecinH3 stellt neben der genetischen Manipulation durch Mutation des Gens eine weitere, kombinierbare Methode dar, Mechanismus und Funktion von Steppke und des IIS zu untersuchen.

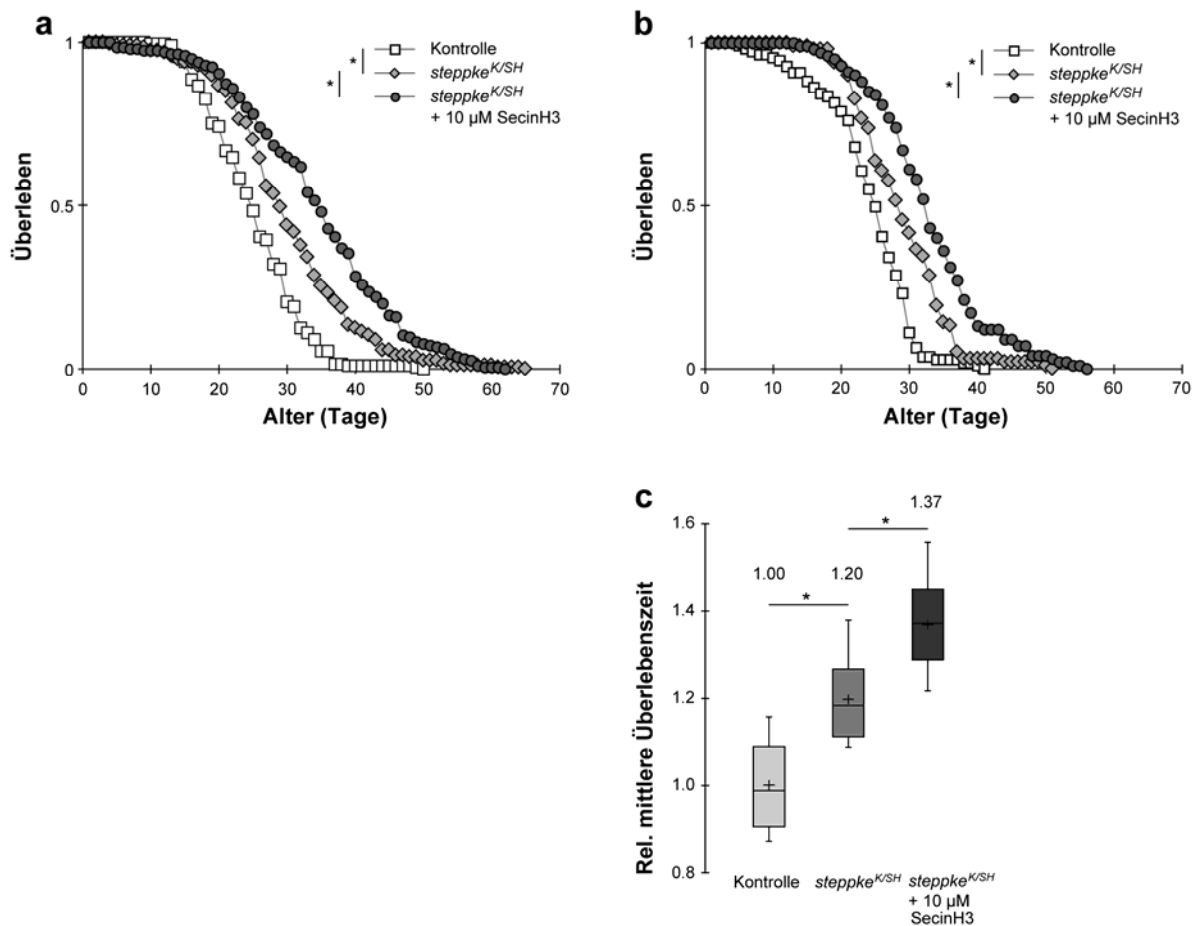


Abbildung 15 SecinH3 verstärkt kumulativ die Verlängerung der Lebensspanne in *steppke*^{K/SH}-Mutanten. (a und b) Überlebensexperimente mit *steppke*^{K/SH}-Mutanten, gefüttert mit 10 µM SecinH3, im Vergleich zu *steppke*^{K/SH}-Mutanten auf Kontrollfutter und isogenen *w*¹¹¹⁸-Fliegen. (c) Relative mittlere Überlebenszeit der beiden kombinierten, unabhängigen Experimente. Die Daten der *steppke*^{K/SH}-Mutanten und der isogenen *w*¹¹¹⁸-Fliegen aus (a-c) wurden bereits in Abbildung 13 dargestellt. Die Werte in (c) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n - und p -Werte sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

5.2.4 Konzentrationsabhängige Effekte von SecinH3

Um den maximalen Effekt von SecinH3 durch Verabreichung über die Nahrung der Fliegen zu ermitteln, wurden weitere Überlebensexperimente mit höheren Konzentrationen des Inhibitors durchgeführt. Abbildung 16 zeigt die Überlebenskurven beim Einsatz von 30 µM SecinH3 im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 16 a und b), einmal zusätzlich gegenüber einer

Konzentration 90 μM SecinH3 (Abb. 16 c). Die Erhöhung der SecinH3-Konzentration auf 30 μM führte zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne der Fliegen gegenüber dem Einsatz von 10 μM . Die weitere Erhöhung der Konzentration auf 90 μM hatte keinen zusätzlichen Effekt. Die relative mittlere Überlebenszeit der mit 30 μM SecinH3 gefütterten Fliegen gegenüber den Kontrollen war signifikant um 27 % höher (Abb. 16 d).

Bei Verwendung von SecinH3-Konzentrationen über 30 μM fiel ein Teil des Inhibitors bei der Herstellung des Futters aus. Es ist nicht klar, ob dieser Teil noch von den Fliegen aufgenommen werden konnte. 30 μM stellte sich beim Einsatz der in dieser Arbeit etablierten Methode zur Verabreichung von SecinH3 als die maximal wirksamste Konzentration zur Verlängerung der Lebensspanne von *Drosophila* heraus.

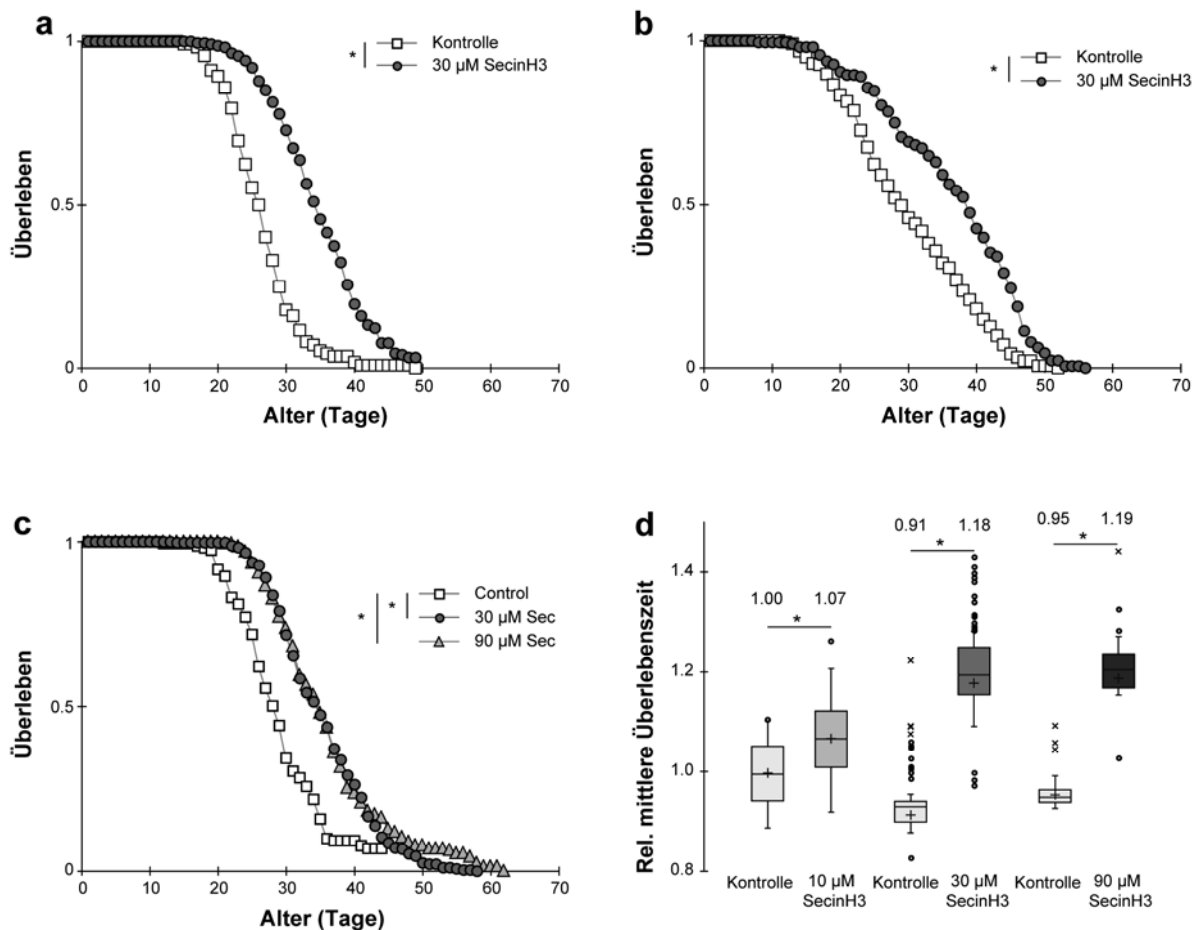


Abbildung 16 SecinH3 wirkt konzentrationsabhängig auf die Lebensspanne von *Drosophila*. (a-c) Überlebensexperimente mit *w¹¹¹⁸*-Fliegen, gefüttert mit SecinH3. Vergleich der Wirkung von 30 μM und (c) 90 μM SecinH3, im Vergleich zu Fliegen auf Kontrollfutter. (d) Relative mittlere Überlebenszeit der drei kombinierten, unabhängigen Experimente mit 30 μM SecinH3, im Vergleich zu der Wirkung von 90 μM und 10 μM SecinH3. Die Daten des Vergleichs von 10 μM SecinH3 und den entsprechenden Kontrollen wurden bereits in Abbildung (14 d) gezeigt. Die Werte in (d) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n - und p -Werte sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

5.2.5 Spezifität von SecinH3

Um die Abhängigkeit des SecinH3-induzierten Effekts der verlängerten Lebensspanne adulter *Drosophila* von den beschriebenen, experimentellen Bedingungen zu testen, wurden drei entscheidende Faktoren des Versuchs in den folgenden Überlebensexperimenten variiert, nämlich die Nahrungsquelle, der Genotyp der Fliegen und der verwendete Inhibitor.

In dem wildtypischen *Drosophila*-Stamm *Oregon*^R wurde getestet, ob der Effekt der verlängerten Lebensspanne durch SecinH3 spezifisch für den bisher in den Experimenten verwendeten Stamm *w*¹¹¹⁸ ist. Bei Fütterung von 30 µM SecinH3 verlängerte sich die Lebensspanne signifikant gegenüber den Kontrollen (Abb. 17 a). Bei der Kombination mit einem weiteren, biologisch unabhängigen Experiment (Daten nicht gezeigt) ergab sich eine signifikante Erhöhung der relativen mittleren Überlebenszeit gegenüber den Kontrollen von 6 % (Abb. 17 b).

Ob die Verlängerung der Lebensspanne durch SecinH3 tatsächlich davon abhängt, dass die Verbindung an die Sec7-Domäne von Cytohesinen binden kann, wurde durch die Verwendung der Verbindung D5 in Überlebensexperimenten getestet. Die Verbindung D5 ist in ihrer Struktur der von SecinH3 ähnlich, wirkt aber nicht als Inhibitor der Sec7-Domäne (Hafner et al., 2006). Bei Fütterung von 10 µM der Verbindung D5 kam es nicht zu einer Verlängerung der Lebensspanne (Abb. 17 c), die relative mittlere Überlebenszeit war nicht signifikant erhöht und beträgt –7 % (Abb. 17 d).

Diese Experimente deuten darauf hin, dass die Wirkung von SecinH3 auf die Sec7-Domäne von Steppke Ursache der Verlängerung der Lebensspanne ist und dieser Effekt nicht spezifisch für einen *Drosophila*-Stamm ist.

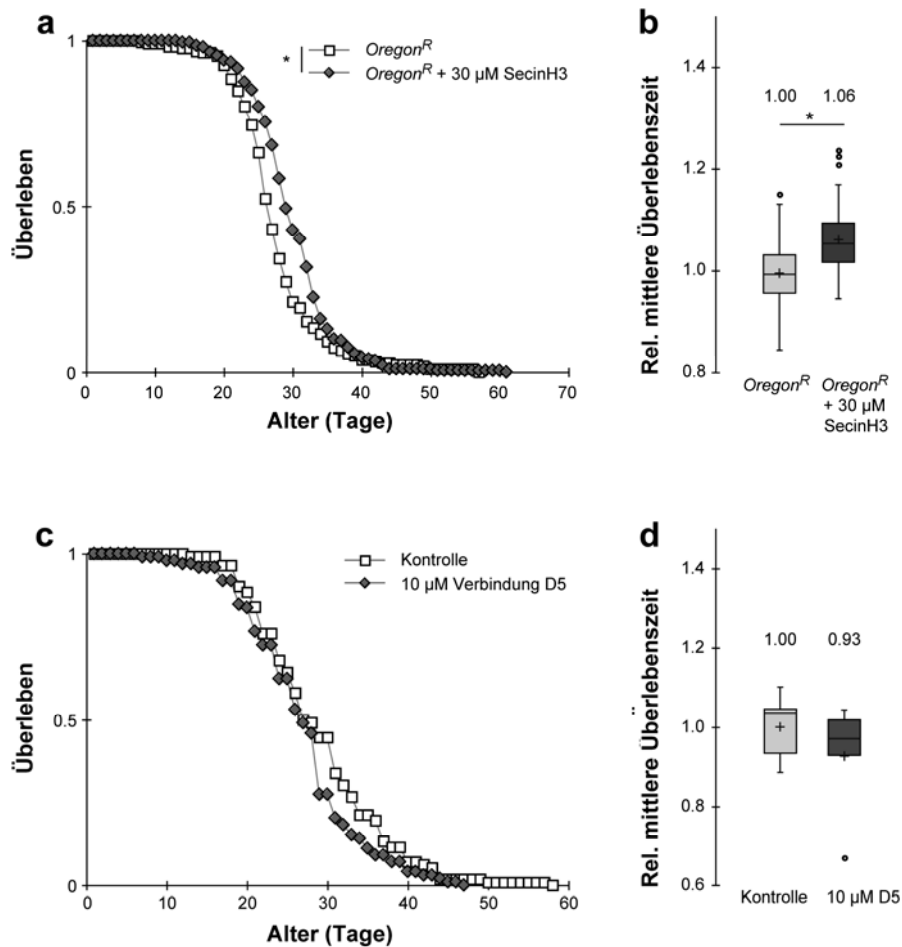


Abbildung 17 Die Wirkung von SecinH3 auf die Lebensspanne ist spezifisch und unabhängig vom Stamm. (a) Überlebensexperiment mit wildtypischen *Oregon^R*-Fliegen, gefüttert mit 30 μ M SecinH3, im Vergleich zu Fliegen auf Kontroll-Futter. (b) Relative mittlere Überlebenszeit von zwei kombinierten unabhängigen Experimenten. (c) Überlebensexperiment mit *w¹¹¹⁸*-Fliegen, gefüttert mit 10 μ M der Verbindung D5, im Vergleich zu Fliegen auf Kontroll-Futter. (d) Relative mittlere Überlebenszeit des Experiments. Die Werte in (b und d) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n- und p-Werte sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

5.2.6 Überlebensexperimente mit SecinH3 in *foxo*-Mutanten

In *Drosophila* S2-Zellen und in verschiedenen humanen Zelllinien wurde bereits gezeigt, dass durch die Inkubation mit SecinH3 die Transkription von Zielgenen des ILS-abhängigen Transkriptionsfaktors FOXO verhindert wird (Becker et al., 2010). In Kapitel 5.3.1 wird dargelegt, dass die Mutation des *steppke*-Gens in adulten Fliegen zu einer transkriptionellen Induktion von AMPs führt, die ebenfalls FOXO-Zielgene sind. Ob auch die Verlängerung der Lebensspanne von adulten *Drosophila* durch SecinH3 über FOXO reguliert wird, wurde in Überlebensexperimenten mit *foxo*-Mutanten getestet. Bei beiden Allelen der

transheterozygoten Mutante *foxo*^{21/W24} handelt es sich um Punktmutationen, die zu einem transkriptionell inaktiven FOXO-Protein führen. Bei Fütterung von 30 µM SecinH3 war die Lebensspanne dieser Mutanten gegenüber den Kontrollen nicht verlängert (Abb. 18 a-c). Abbildung 18 d zeigt die Kombination der drei biologisch unabhängigen Überlebensexperimente. Die relative mittlere Überlebenszeit ist nicht signifikant erhöht. Die Regulation des Transkriptionsfaktors FOXO ist also notwendig für die Verlängerung der Lebensspanne von *Drosophila* durch den Inhibitor SecinH3.

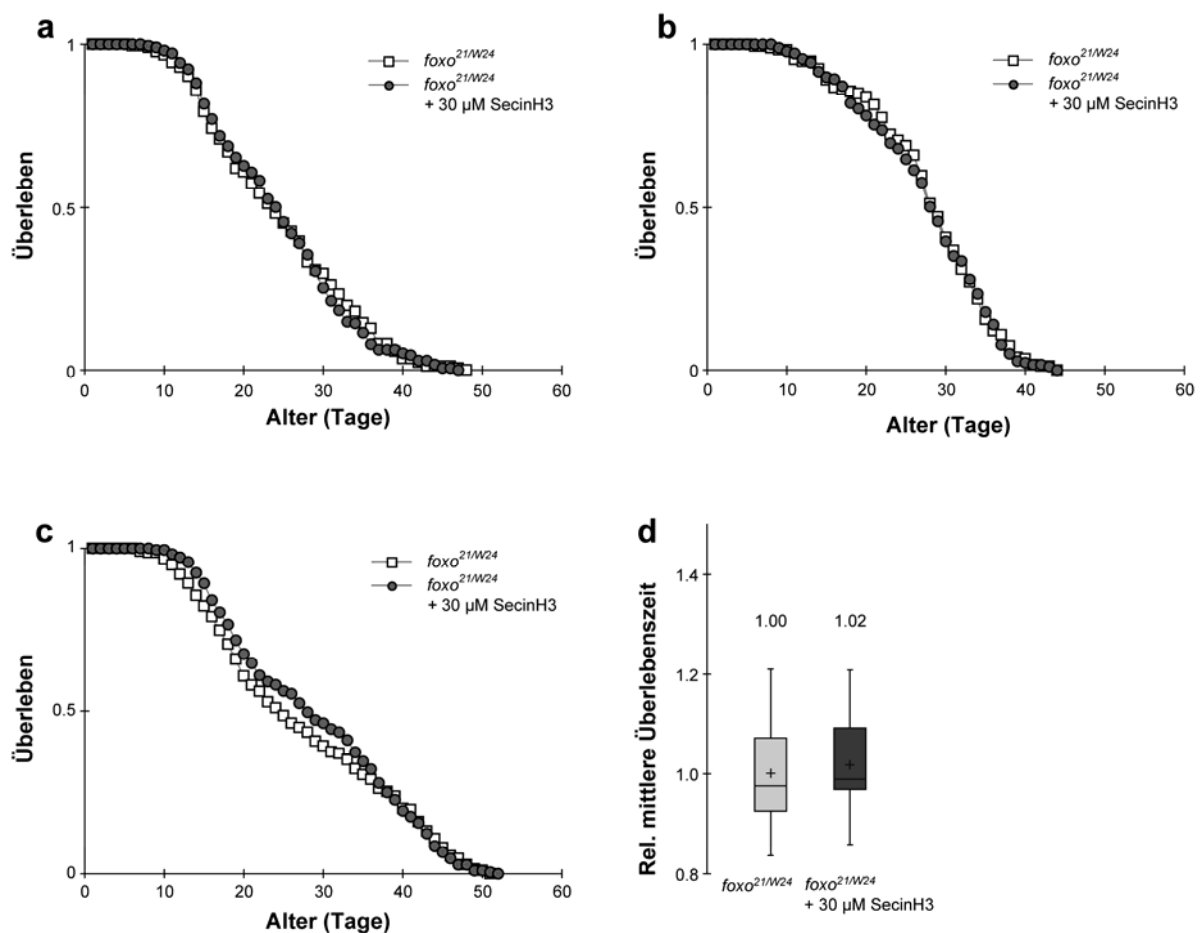


Abbildung 18 SecinH3 wirkt FOXO-abhängig auf die Lebensspanne von *Drosophila*. (a-c) Überlebensexperimente mit *foxo*^{21/W24}-Mutanten, gefüttert mit 30 SecinH3, im Vergleich mit Fliegen auf Kontroll-Futter. (d) Relative mittlere Überlebenszeit der drei kombinierten unabhängigen Experimente. Die Werte in (d) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n- und p-Werte sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

5.2.7 Screening nach SecinH3-Varianten

Bisher war nur eine chemische Verbindung bekannt - nämlich SecinH3 -, die in der Lage war, die Funktion der Sec7-Domäne von Cytohesinen aus verschiedenen Organismen zu inhibieren. Mit der Absicht, weitere derartige Verbindungen zu identifizieren, wurde ein virtuelles Screening durchgeführt, ausgehend von der bekannten Struktur von SecinH3 (Stumpfe et al., 2010). Alle 283 durch dieses Verfahren gefundenen Kandidaten wurden weltweit auf ihre kommerzielle Verfügbarkeit überprüft. 145 dieser nun als Secin benannten Kandidaten wurden und drei Laboren für funktionelle Experimente zur Verfügung gestellt. Diese Experimente waren bereits etabliert, um die Wirkung von SecinH3 auf Cytohesine zu untersuchen. Sie wurden nun eingesetzt, um aus den Kandidaten Verbindungen zu identifizieren, die effizienter wirken als SecinH3. Um die Wirkung der Kandidaten auf das *Drosophila*-Cytohesin Steppke zu testen, wurde ein S2-Zellkulturexperiment verwendet. Dazu wurden S2-Zellen mit einem Secin inkubiert und dann kurz mit Insulin stimuliert. Anschließend wurden die Transkriptionslevel des FOXO-Zielgens *4E-BP* in einer quantitativen Real Time PCR gemessen (Abb. 19). Der FOXO Transkriptionsfaktor wird über die stimulierte IIS-Aktivität durch Phosphorylierung im Cytoplasma der Zelle gehalten und kann nicht transkriptionell wirken. Reduziert sich die Signalweiterleitung aufgrund der Inhibition von Steppke durch ein Secin, wird mehr FOXO in den Zellkern transportiert, wodurch der Transkriptionsfaktor dann seine Zielgene, z.B. *4E-BP*, aktivieren kann. Die Höhe der Transkriptlevel ist das Maß für die Effizienz der Steppke-Inhibition durch den Secin, relativ zu dem Transkriptlevel induziert durch SecinH3. Alle Kandidaten, die zu einem mehr als zweifach höheren *4E-BP*-Expressionslevel führten, wurden als effizientere Secins bezeichnet. Es wurden sieben solcher Secins identifiziert, wobei Secin16 durch einen 20fach höheren Transkriptlevel eine besonders starke Inhibitionswirkung hatte (Abb. 19).

Die so gewonnenen Daten wurden mit denen der anderen beiden experimentellen Ansätze verglichen. Zum einen wurde in diesen Experimenten die Fähigkeit der Secins getestet, die Guaninaustausch-Aktivität des humanen Cytohesin-2 zu inhibieren, zum anderen, ob sie die über die humanen Cytohesine-1 und -2 vermittelte Adhäsion von Jurkat E6 T-Zellen über β 2-Integrine reduzieren (Stumpfe et al., 2010). Neben einigen Überlappungen zwischen zwei der drei Experimente, wurden Secin132 und Secin16 in allen Experimenten als effektiver gegenüber SecinH3 identifiziert.

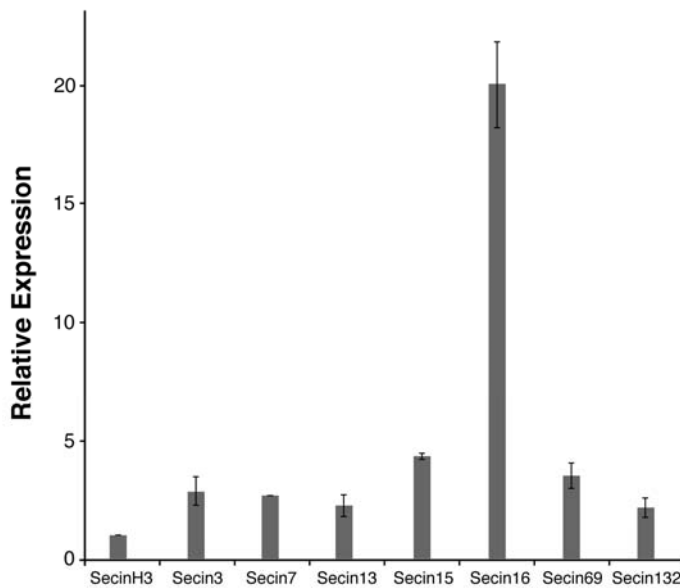


Abbildung 19 Sieben SecinH3-Alternativen, durch ein Screening in S2-Zellen identifiziert. Expressionlevel von 4E-BP in S2-Zellen nach Inhibition des IIS durch einen im Screening eingesetzten Secin im Vergleich zu SecinH3. Abgebildet sind alle Secins, die zu einer mehr als zweifach höheren 4E-BP-Expression als SecinH3 führten. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines einzelnen, repräsentativen Experiments. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD.

5.2.8 Überlebensexperimente mit Secin16

Wegen der deutlich höheren Effizienz von Secin16 gegenüber SecinH3 bei der Blockierung der IIS-Aktivität in S2-Zellen, wurde die Substanz ebenfalls in Überlebensexperimenten getestet. Eine höhere Effizienz sollte es ermöglichen, beim Einsatz geringerer Konzentrationen eine Verlängerung der Lebensspanne zu erzielen. Der Einsatz einer niedrigeren Konzentration würde auch weniger Probleme bei der Lösung von Secin16, das sich auch in DMSO löst, bei der Herstellung des Fliegenfutters verursachen. Abbildung 20 a zeigt die Überlebenskurve von Fliegen, die mit 10 μ M Secin16 gefüttert wurden, im Vergleich mit Kontrollen. Gegenüber den Kontrollen lebten diese Fliegen signifikant länger, die relative mittlere Überlebenszeit war um 9 % signifikant höher (Abb. 20 b). Der Einsatz von höheren oder niedrigeren Konzentrationen von Secin16 hatte keine weitere Auswirkung auf die Lebensspanne (Daten nicht gezeigt).

Mit Secin16 wurde eine weitere Verbindung gefunden, die in *Drosophila* zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt.

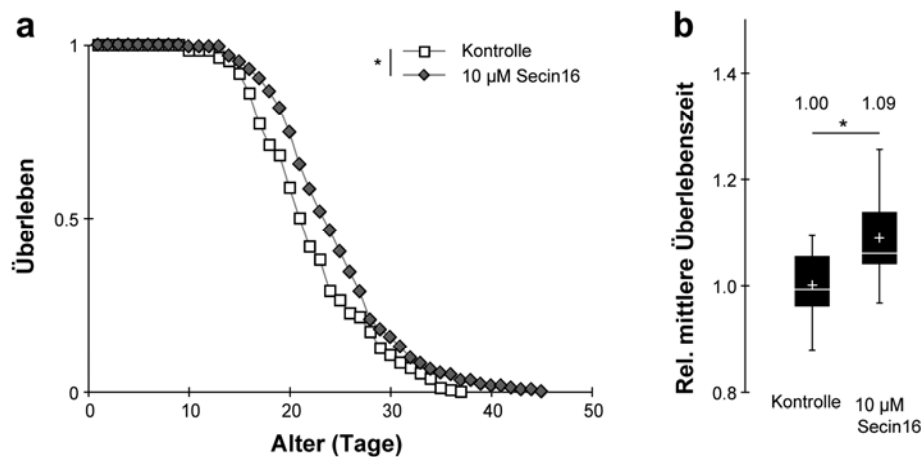


Abbildung 20 Der neue Steppke-Inhibitor Secin16 verlängert die Lebensspanne von *Drosophila*. (a) Überlebensexperiment mit w^{1118} -Fliegen, gefüttert mit 10 µM Secin16, im Vergleich zu Fliegen auf Kontrollfutter. (b) Relative mittlere Überlebenszeit von zwei kombinierten, unabhängigen Experimenten. Die Werte in (b) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n - und p -Werte sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

5.3 IIS-abhängige Regulation der Immunabwehr über Steppke

5.3.1 AMP-Expression in *steppke*-Mutanten

In den Kapiteln 5.1.2 und 5.1.3 wurden die Anwesenheit und die Funktion von essentiellen FOXO/Forkhead-Bindemotiven in der Promotorsequenz von AMPs beispielhaft für *Drosomycin* gezeigt. Die transkriptionelle Regulation von AMPs in der *Drosophila*-Larve durch den IIS über den Transkriptionsfaktor FOXO und die Rolle von Steppke ist in der Veröffentlichung von Becker et al. beschrieben. Diese Regulation wurde sowohl für den Fettkörper, dem Hauptimmunorgan von *Drosophila*, wie auch für verschiedene immunologisch aktiven Barriereepithelien - z.B. den Darm - gezeigt (Becker et al., 2010). Um zu untersuchen, ob eine solche transkriptionelle Regulation der AMPs auch in adulten Tieren stattfindet, wurden die Transkriptlevel von Vertretern aller sieben in *Drosophila* bekannten induzierbaren AMP-Klassen (Lemaitre und Hoffmann, 2007) in *steppke*^{K/SH}-Mutanten im Vergleich zu w^{1118} -Kontrollen durch eine quantitative Real Time PCR gemessen. In der Untersuchung von ganzen adulten Tieren fand sich eine Regulation eines Subsets von AMPs (Daten nicht gezeigt). Als Beispiel für ein immunologisch relevantes Barriereepithel wurde die Expression der AMPs auch in präparierten Mitteldärmen der Fliegen untersucht. In

Abbildung 21 sind die Ergebnisse von drei biologisch unabhängigen Experimenten gegenüber gestellt. Außer *Drosomycin* und *Metchnikowin* waren die Transkriptlevel aller anderen untersuchten AMPs in den *steppke*^{K/SH}-Mutanten gegenüber den *w*¹¹¹⁸-Kontrollen deutlich erhöht, *Attacin A*, *Cecropin A1* und *Cecropin C* waren signifikant reguliert.

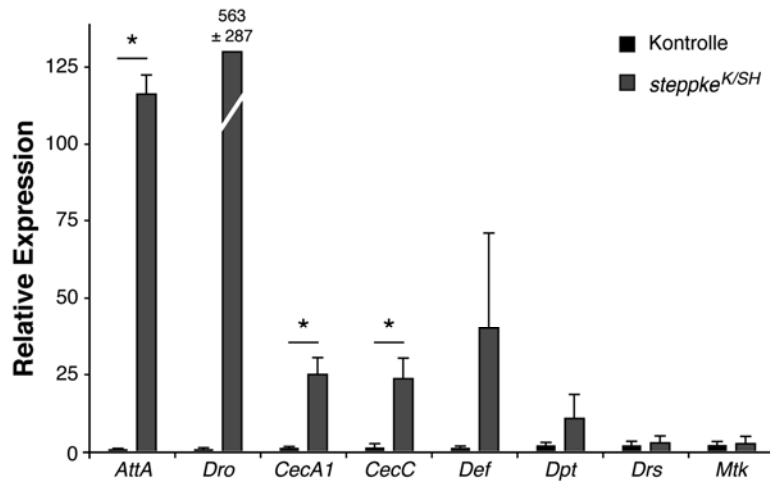


Abbildung 21 *Steppke* induziert die Transkription von AMPs im Darm von adulten *Drosophila*. Expression von AMPs im Mitteldarm und im Proventrikulus von *steppke*^{K/SH}-Mutanten, relativ zu isogenen *w*¹¹¹⁸-Fliegen. Die Werte sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. n -, p - und SEM-Werte sind in Tabelle 3 angegeben.

5.3.2 Natürliche Infektion von *steppke*-Mutanten

Der Mechanismus der FOXO-abhängigen AMP-Regulation in *steppke*^{K/SH}-Mutanten ist bereits ausführlich beschrieben, über die biologische Funktion einer solchen Regulation wurde bisher nur spekuliert (Becker et al., 2010). Bekannt ist, dass AMPs Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems sind, die direkt gegen Mikroorganismen wirken. Sie werden bei einer Infektion durch den Toll- oder den Imd-Signalweg aktiviert, entweder lokal, systemisch oder in Kombination (Lemaitre und Hoffmann, 2007; Uvell und Engstrom, 2007). Um zu untersuchen, ob die FOXO-abhängige Erhöhung der AMP-Level in *steppke*^{K/SH}-Mutanten einen positiven Effekt auf den Verlauf einer Infektion hat, wurden orale Infektionen mit dem natürlichen, virulenten *Drosophila*-Pathogen *P. entomophila* durchgeführt (Liehl et al., 2006; Vodovar et al., 2005). Die in *steppke*^{K/SH}-Mutanten stark exprimierten AMPs *Attacin A* und *Drosocin* sind in der Literatur als besonders wirksam gegen gram-negative Bakterien wie *P. entomophila* beschrieben (Tzou et al., 2002). In der Wildbahn infizieren sich *Drosophila*-

Fliegen über die Nahrung mit diesen Boden bewohnenden Bakterien, die sich dann lokal im Fliegendarm ansiedeln und dort ihre pathogene Wirkung entfalten (Vodovar et al., 2005). In diesem Experiment wurden die Fliegen für vier Stunden über eine Zuckerlösung mit *P. entomophila* infiziert, anschließend lysiert und die bakterielle Belastung des Darms durch die Pathogene gemessen. In Abbildung 22 sind vier biologisch unabhängige Experimente kombiniert und die relativen Verhältnisse der kolonieformenden Einheiten (KFEs) im Darm dargestellt. Die Belastung des Darms von w^{1118} -Kontrolltieren war signifikant um den Faktor 2,2 höher als in *steppke*^{K/SH}-Mutanten. Die reduzierte Anzahl an Bakterien in dieser frühen Phase der Infektion könnte den nun einsetzenden klassischen Immunreaktionen der Fruchtfliege helfen, die Infektion erfolgreicher zu bekämpfen (Liehl et al., 2006).

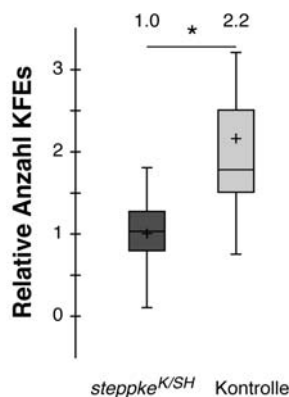


Abbildung 22 *steppke*^{K/SH}-Mutanten zeigen eine verbesserte Immunabwehr. Bakterielle Belastung von weiblichen adulten *steppke*^{K/SH}-Mutanten relativ zu isogenen w^{1118} -Fliegen nach natürlicher Infektion mit *P. entomophila*. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte für die kolonieformenden-Einheiten (KFEs). Ein Stern bedeutet $P < 0.05$. n - und p -Werte sind in Tabelle 4 angegeben.

5.4 FOXO-abhängige Regulation der Immunabwehr

5.4.1 AMP Expression durch FOXO im Darm

Die Reduktion der Aktivität des Insulinsignalwegs in *steppke*^{K/SH}-Mutanten führte zu einer FOXO-abhängigen Erhöhung der Transkriptionslevel einiger AMPs im Mitteldarm von adulten *Drosophila* (Abb. 21). Um herauszufinden, ob die Ursache dafür eine lokale Aktivierung von FOXO sein könnte, wurde das wildtypische *foxo*^{WT}-Konstrukt unter der Kontrolle des *caudal*-Promotors in *caudal-gal4/UAS-foxo*^{WT}-Fliegen überexprimiert. Das Gen *caudal* wird in wildtypischen adulten *Drosophila* spezifisch im Mitteldarm exprimiert (Ryu et

al., 2004; 2008). Die Fliegendärme wurden präpariert und die Transkriptlevel durch eine quantitative Real Time PCR bestimmt. Abbildung 23 stellt eine Kombination von drei biologisch unabhängigen Experimenten dar. Gegenüber der Kontrolle, der heterozygoten Treiberline *caudal-gal4/+*, waren einige der getesteten AMPs in den *cad-gal4/UAS-foxo^{WT}*-Fliegen transkriptionell induziert, darunter, wie auch in den *steppke^{K/SH}*-Mutanten, besonders stark die AMPs *Attacin A* und *Drosocin*. Die erfolgreiche Induktion von FOXO bewiesen die um den Faktor 12,3 signifikant erhöhten Transkriptlevel des Gens (Abb. 23).

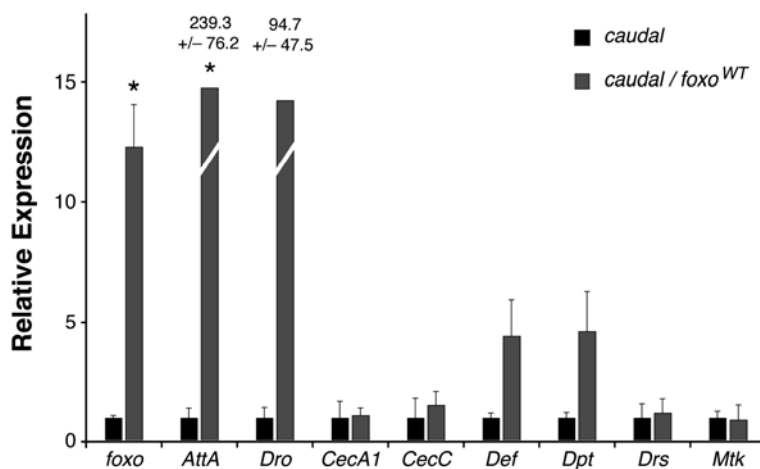


Abbildung 23 FOXO induziert die Transkription von AMPs im Darm von adulten *Drosophila*. Relative Expression von AMPs im Mitteldarm und im Proventrikulus von Fliegen, die *foxo^{WT}* im *caudal*-Muster exprimieren (*caudal/foxo^{WT}*), im Vergleich zu Kontroll-Fliegen (*caudal*). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$, die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. n-, p- und SEM-Werte sind in Tabelle 3 angegeben.

Die quantitative Real Time von zwei Datensätzen wurde von Disha Varma durchgeführt.

5.4.2 Natürliche Infektion nach AMP-Induktion im Darm

Die erhöhten Expressionslevel von AMPs in adulten *steppke^{K/SH}*-Mutanten vor einer Infektion (Abb. 21) führten zu einer reduzierten Anzahl von Pathogenen im Darm der Fliegen (Abb.22). Ob auch die ausschließlich lokale, FOXO-abhängige, transkriptionelle Induktion von AMPs (Abb. 23) ausreicht, um einen ähnlichen Effekt zu erzeugen, wurde durch weitere natürliche Infektionsexperimente getestet. Abbildung 24 a zeigt die Kombination von sechs biologisch unabhängigen Experimenten mit *caudal-gal4/UAS-foxo^{WT}*-Fliegen und drei unterschiedlichen

Kontrollen. Je zweimal wurden Fliegen der Genotypen *caudal-gal4/CyO*, *UAS-foxo^{WT}* und *UAS-foxo^{WT}/CyO* als Kontrollen verwendet. Nach einer natürlichen, oralen Infektion über vier Stunden mit *P. entomophila* wurden die Fliegen lysiert und die bakterielle Belastung des Darms wurde mit dem Pathogen gemessen. In allen Fällen war diese Belastung in den Kontrollen signifikant höher als in den *caudal-gal4/UAS-foxo^{WT}*-Fliegen (Abb. 24 a). Um zu zeigen, dass dieser Effekt nicht spezifisch für einen Bakterienstamm ist, wurde das Infektionsexperiment mit dem ebenfalls gram-negativen Fliegenpathogen *Erwinia carotovora* 15 durchgeführt (Abb. 24 b). In der Abbildung ist die Kombination von zwei biologisch unabhängigen Experimenten mit *UAS-foxo^{WT}*-Fliegen als Kontrolle. Auch bei der Verwendung dieses Bakterienstamms war nach vierstündiger natürlicher Infektion die bakterielle Belastung des Darm mit dem Pathogen in der Kontrolle signifikant höher als in den *caudal-gal4/UAS-foxo^{WT}*-Fliegen. Die Detektion einer unterschiedlichen Anzahl von Bakterien im Darm nach einer Infektion über die Nahrung könnte auch auf eine größere Nahrungsaufnahme der genotypisch unterschiedlichen Fliegen zurückzuführen sein. Um dies zu prüfen, wurde mit einem CAFE-Assay die aufgenommene Nahrungsmenge der Fliegen pro Stunde über mehrere Tage gemessen. Es konnte keine größere Nahrungsaufnahme der *caudal-gal4/UAS-foxo^{WT}*-Fliegen gegenüber den *UAS-foxo^{WT}*- und *caudal-gal4/CyO*-Kontrollen gemessen werden (Abb. 24 c). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine FOXO-abhängige, lokale Induktion von AMPs im Mitteldarm von adulten *Drosophila* vor einer Infektion zu einer geringeren Belastung mit dem aufgenommenen Pathogen führt.

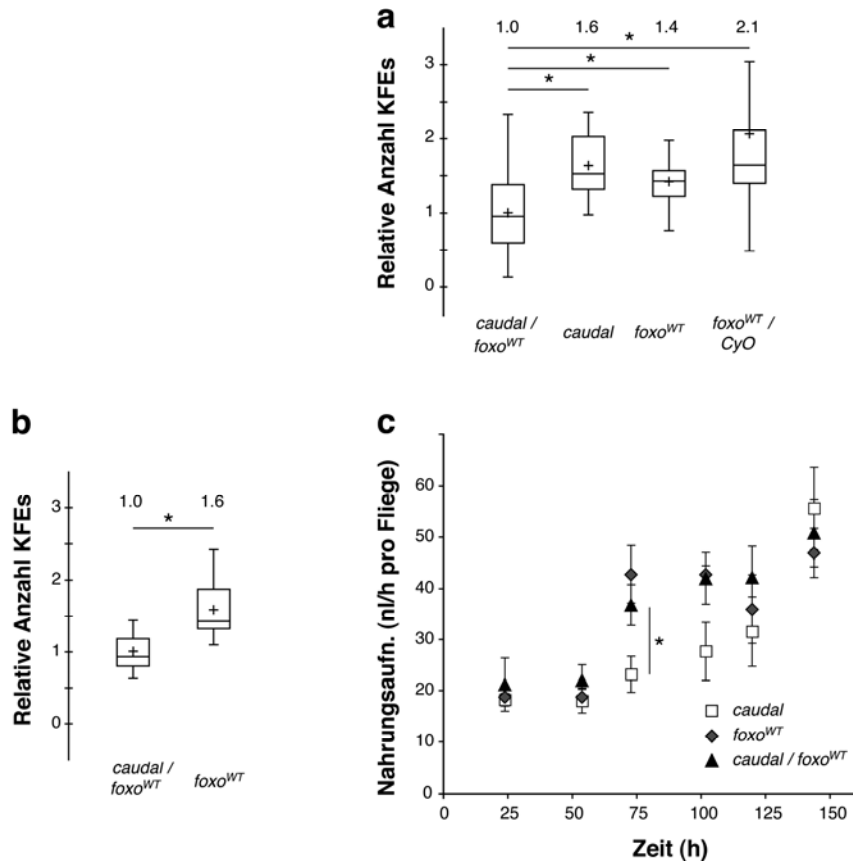


Abbildung 24 Die Expression von *foxo* im Darm von *Drosophila* führt zu einer verbesserten Immunabwehr. (a) Relative bakterielle Belastung nach natürlicher Infektion mit *P. entomophila*. Vergleich von Fliegen, die *foxo*^{WT} im caudal-Muster exprimieren (*caudal/foxo*^{WT}), mit drei verschiedenen Kontroll-Fliegenlinien (*caudal*, *foxo*^{WT}, *foxo*^{WT}/CyO). (b) Relative bakterielle Belastung nach natürlicher Infektion mit *E. carotovora* 15. Vergleich von Fliegen, die *foxo*^{WT} im caudal-Muster exprimieren (*caudal/foxo*^{WT}) mit Kontrollfliegen (*foxo*^{WT}). (c) Messung der Nahrungsaufnahme der *caudal/foxo*^{WT}-Fliegen, im Vergleich zu zwei verschiedenen Kontrollfliegenlinien (*caudal*, *foxo*^{WT}) mit einem CAFE-Assay. Die Werte in (a und b) sind Mittelwerte für die kolonieformenden Einheiten (KFEs). Die Fehlerbalken in (c) repräsentieren den SEM. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n -, p - und SEM-Werte sind in den Tabellen 4 und 5 angegeben.

5.5 Einfluss einzelner AMPs auf die Immunabwehr und die Lebensspanne

5.5.1 Überlebensexperimente bei Expression von einzelnen AMPs

Es wurde gezeigt, dass die dauerhafte FOXO-abhängige Induktion von AMPs in adulten *steppke*^{K/SH}-Mutanten zu einer verbesserten Immunabwehr im Darm der Fruchtfliege führt (Abb. 22). Dieser Mechanismus könnte zu der beobachteten Verlängerung der Lebensspanne von Tieren mit einer reduzierten Aktivität des IIS beitragen, wie z.B. in *steppke*^{K/SH}-Mutanten (Abb. 13). Um zu testen, ob allein die Expression von AMPs eine Verlängerung der

Lebensspanne bewirken kann, wurden einzelne AMPs mit dem durch Mifepriston chemisch induzierbaren GAL4/UAS-GeneSwitch-System (GS) über die gesamte Lebensspanne der Tiere induziert. Dieses System eignet sich besonders für Überlebensexperimente, da Experimental- und Kontrolltiere genetisch identisch sind. Es schließt Effekte eines unterschiedlichen genetischen Hintergrundes auf die Lebensspanne der Fliegen aus. Für eine ubiquitäre Expression wurde die Treiberlinie *tubulin^{GS}-gal4* verwendet. Im Expressionsmuster des Gens *tubulin* wurde so durch Zuführung von Mifepriston mit dem Futter der Tiere die Transkription eines einzelnen AMPs induziert. Um die induzierten Transkriptlevel zu variieren, wurden unterschiedliche Konzentrationen von Mifepriston getestet. Abbildung 25 zeigt die *Drosocin*-Expression gemessen mit einer quantitativen Real Time PCR, beispielhaft für die Konzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml. Die Expressionslevel blieben über die drei gemessenen Zeitpunkte relativ konstant, unterschieden sich aber deutlich je nach verwendeter Konzentration.

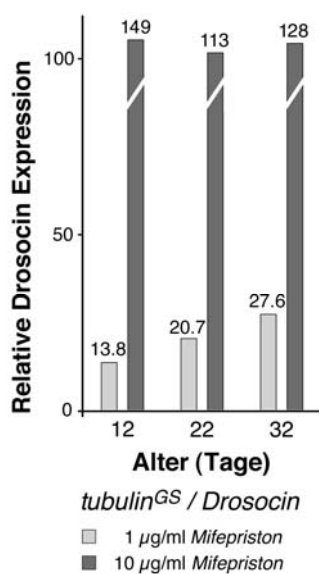


Abbildung 25 *Drosocin*-Expression mit dem GeneSwitch-System. Relative Expression von *Drosocin* in *tubulin^{GS}/Drosocin*-Fliegen nach Induktion mit 1 µg/ml oder 10 µg/ml Mifepriston im Alter von 12, 22 und 32 Tagen. Die Abbildung zeigt ein einzelnes Experiment.

Die Überlebensexperimente wurden mit der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet und die Signifikanz der Differenzen der mittleren Überlebenszeit wurde mit einem Student's t-Test bewertet. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Überlebensexperimente bei Expression des AMPs in *tubulin^{GS}-gal4/UAS-Drosocin*-Fliegen zu sehen. Durch Induktion mit 1 µg/ml Mifepriston wurde die Lebensspanne signifikant verlängert (Abb. 26 d-f). Der Effekt war bei

einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ größer und über mehrere Versuche auch stabiler (Abb. 26 a-c).

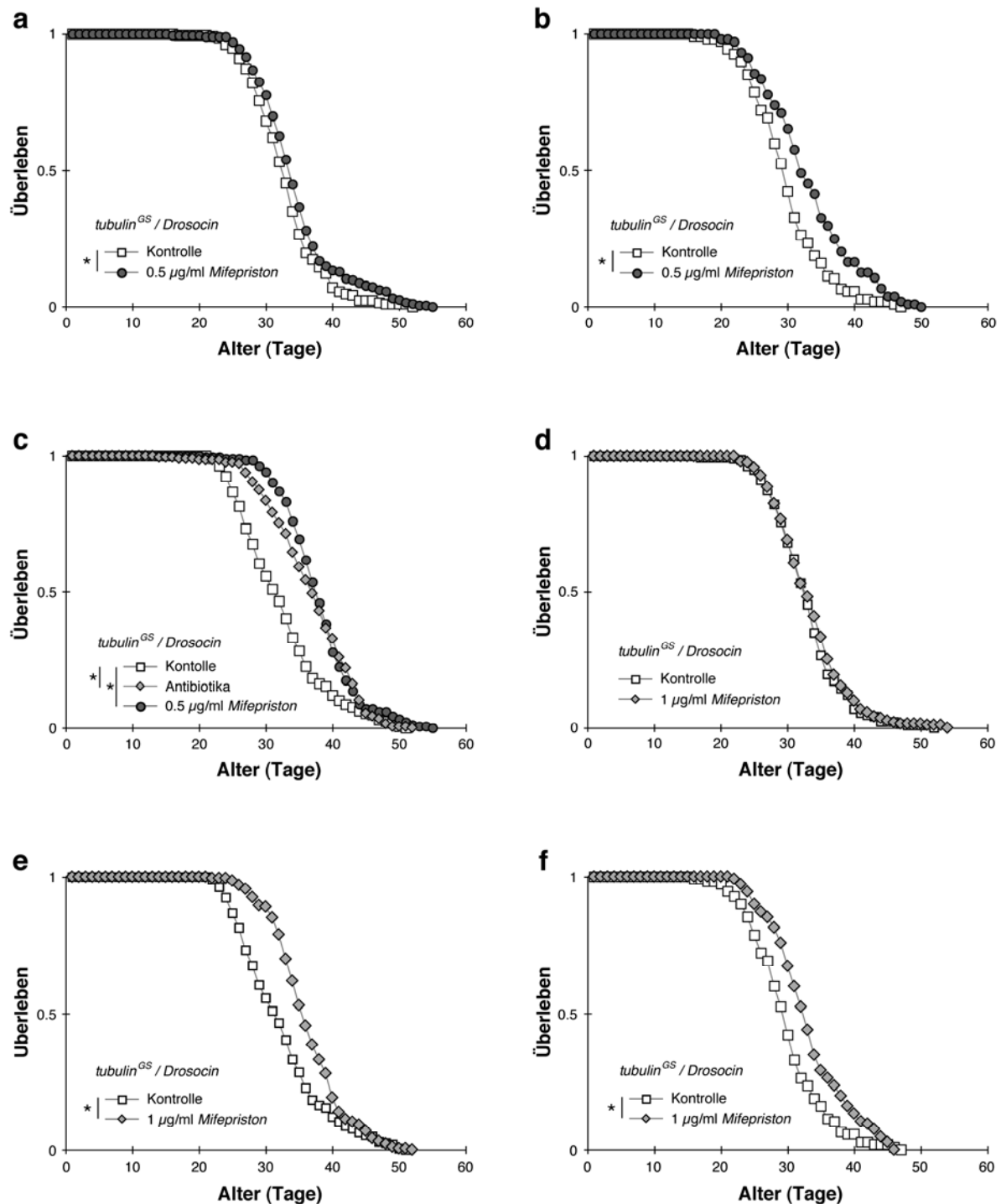


Abbildung 26 Die Expression von Drosocin verlängert die Lebensspanne von *Drosophila*. (a-c) Überlebensexperimente mit *tubulin^{GS}/Drosocin*-Fliegen, gefüttert mit oder ohne 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Mifepriston. (c) Zusätzlicher Vergleich mit uninduzierten Fliegen, die auf keimreduziertem Antibiotikafutter gehalten wurden. (d-f) Überlebensexperimente mit *tubulin^{GS}/Drosocin*-Fliegen, gefüttert mit oder ohne 1 $\mu\text{g/ml}$ Mifepriston. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n - und p -Werte sind in Tabelle 1 angegeben.

Abbildung 27 zeigt die Kombination der relativen mittleren Überlebenszeit der beiden erfolgreich eingesetzten Mifepristonkonzentrationen 0,5 µg/ml und 1 µg/ml. Die relative mittlere Überlebenszeit gegenüber nicht induzierten Kontrollen war in beiden Fällen signifikant höher und lag bei 11 % bzw. 8 %. Bei Konzentrationen von 2 µg/ml und 10 µg/ml Mifepriston im Futter wurde keine Verlängerung der Lebensspanne der Tiere gegenüber nicht induzierten Kontrollen gemessen (Abb. 27 c und d).

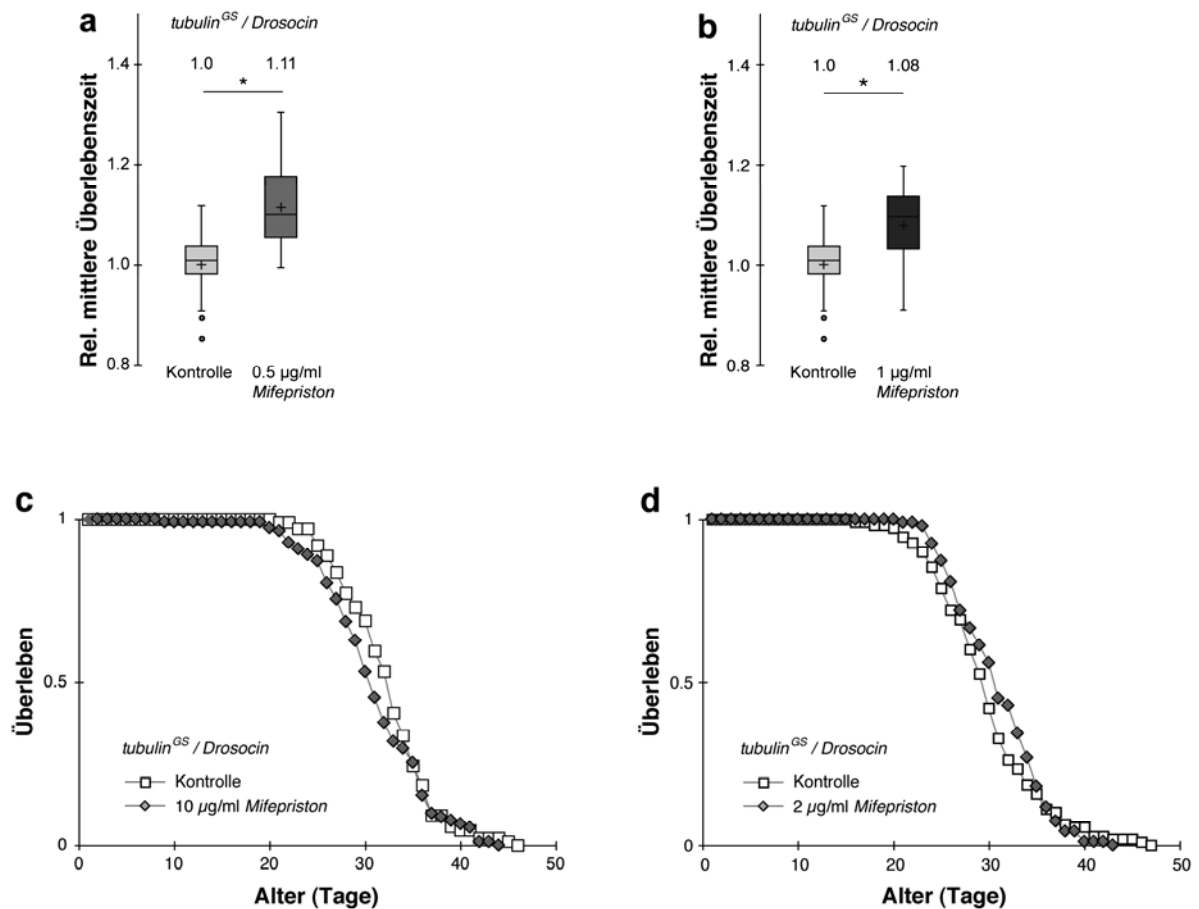


Abbildung 27 Die Verlängerung der Lebensspanne durch Drosocin ist Level-abhängig. (a und b) Relative mittlere Überlebenszeit der jeweils drei kombinierten unabhängigen Experimente aus Abbildung (26). Drosocin-Induktion mit 0,5 µg/ml oder 1 µg/ml Mifepriston. (c) Überlebensexperiment mit *tubulin^{GS}/Drosocin*-Fliegen, gefüttert mit oder ohne 10 µg/ml Mifepriston. (d) Überlebensexperiment mit *tubulin^{GS}/Drosocin*-Fliegen, gefüttert mit oder ohne 2 µg/ml Mifepriston. Die Werte in (a und b) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n- und p-Werte sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

Es wurde ein weiteres AMP identifiziert, welches durch Überexpression mit dem *tubulin^{GS}-gal4*-System zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne gegenüber nicht induzierten Kontrollen führte. Abbildung 28 a und b stellt zwei Überlebenskurven bei einer

Induktion von *Cecropin A1* mit einer Konzentration von 1 µg/ml Mifepriston im Futter der Fliegen dar. Die relative mittlere Überlebenszeit der Kombination von beiden biologisch unabhängigen Experimenten war signifikant und betrug 6 % (Abb 28 c). Geringere Mifepriston-Konzentrationen verursachten keine verlängerte, höhere Konzentrationen eine verkürzte Lebensspanne (Daten nicht gezeigt).

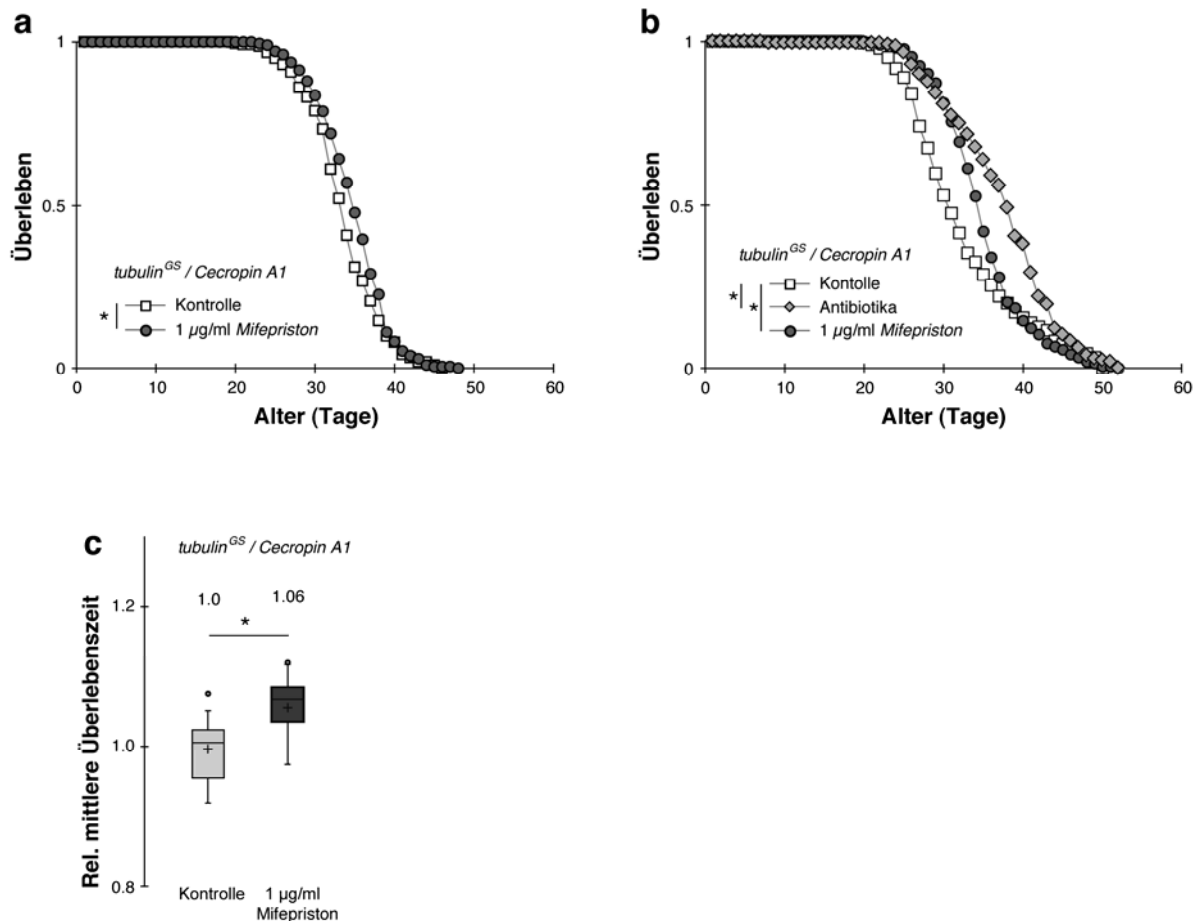


Abbildung 28 Die Expression von *Cecropin A1* verlängert die Lebensspanne von *Drosophila*. (a und b) Überlebensexperimente mit *tubulin^{GS}/Cecropin A1*-Fliegen, gefüttert mit oder ohne 1 µg/ml Mifepriston. (b) Zusätzlicher Vergleich mit uninduzierten Fliegen, die auf keimreduziertem Antibiotikafutter gehalten wurden. (c) Relative mittlere Überlebenszeit der beiden kombinierten, unabhängigen Experimente. Die Werte in (c) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n- und p-Werte sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

Abhängig vom induzierten Transkriptlevel führte die erhöhte Expression der AMPs *Drosocin* und *Cecropin A1* zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne und könnte damit auch zu der beobachteten Verlängerung der Lebensspanne von IIS-Mutanten wie *steppke^{K/SH}*

beitragen. Mit der Überexpression von *Drosocin* konnte im Vergleich zu *Cecropin A1* ein deutlich stärkerer Effekt bei einem geringeren Einsatz von Mifepriston erzielt werden.

5.5.2 Expressionsmuster des Tubulin-Treibers im Darm

Es wurde dargelegt, dass die dauerhafte, ubiquitäre Regulation eines einzelnen AMPs einen Einfluss auf die Lebenserwartung von adulten *Drosophila* hat. Ob dieser Effekt auf eine verbesserte Immunabwehr der Tiere zurückzuführen ist, sollte mit dem bereits für die *steppke*^{K/SH}-Mutanten verwendeten natürlichen Infektionsmodell mit dem Fliegenpathogen *P. entomophila* herausgefunden werden. Da nur die lokale Immunantwort im Darm einen Einfluss auf den Infektionsverlauf hat (Liehl et al., 2006), wurde zuvor geprüft, ob durch den *tubulin*^{GS}-Treiber, verwendet für die zuvor beschriebenen Überlebensexperimente, eine Expression im Darm induziert werden kann. In Fliegen mit dem Genotyp *tubulin*^{GS}-*gal4/UAS-gfp* wurde GFP als Reporter im Muster von *tubulin* exprimiert. Die Expression wurde durch 1 µg/ml Mifepriston im Futter der Fliege induziert. Abbildung 29 zeigt mikroskopische Aufnahmen eines präparierten Mitteldarms nach einer Immunfluoreszenzfärbung. In Blau sind die mit DAPI markierten Zellkerne, in Rot ist das mit Phalloidin markierte Aktinzytoskelett und in Grün das über Immunfärbung markierte Reporterprotein GFP dargestellt. Zu erkennen ist eine GFP- Expression im Mitteldarm mit zwei Regionen einer deutlich erhöhten Expression. Die erste befindet sich im Bereich des hinteren Mitteldarms, die zweite in einem Band um den Proventrikulus. Diese Region ist als immunologisch aktiver Bereich bekannt, in dem AMPs durch die klassischen Immunsignalwege Toll und Imd bei einer natürlichen Infektion aktiviert werden (Liehl et al., 2006). Eine Expression von AMPs speziell in dieser Region des Darms scheint besonders geeignet für eine effektive Bekämpfung von eindringenden Pathogenen zu sein.

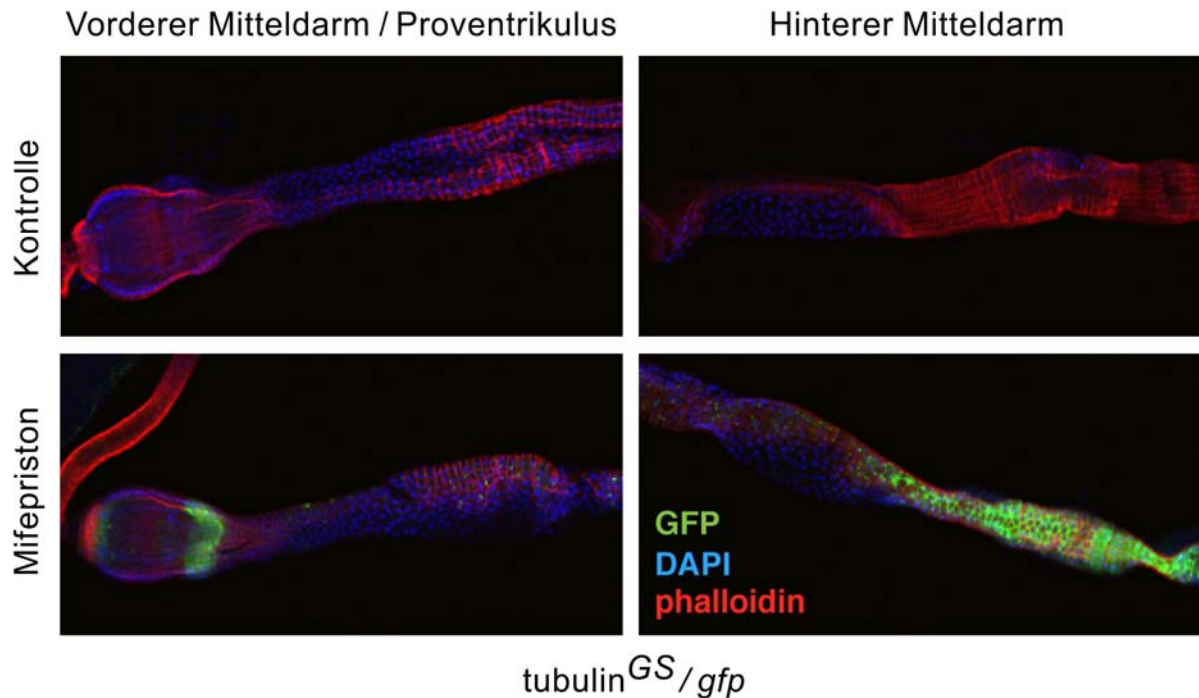


Abbildung 29 Das Muster der Genexpression im Mitteldarm von *tubulin^{GS}*-Fliegen. GFP-Expression (grün) im Mitteldarm von *tubulin^{GS}/gfp*-Fliegen, induziert mit 1 µg/ml Mifepriston. Aktin wurde mit Phalloidin markiert (rot), die Zellkerne mit DAPI (blau). Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Bereiche mit der stärksten GFP-Reporter-Expression. Dies sind der Proventrikulus und eine Region im hinteren Mitteldarm.

5.5.3 Natürliche Infektion nach Expression einzelner AMPs

Durch den Treiber *tubulin^{GS}-gal4* kann Genexpression im Mitteldarm von adulten Fliegen induziert werden. Die Regionen der Expression wurden mit einem *UAS-GFP*-Reporterkonstrukt identifiziert. Mit einer quantitativen Real Time PCR wurden die Transkriptlevel von *Drosocin* in *tubulin^{GS}-gal4/UAS-Drosocin*-Fliegen und von *Cecropin A1* in *tubulin^{GS}-gal4/UAS-Cecropin A1*-Fliegen nach Induktion mit Mifepriston in präparierten Mitteldärmen bestimmt. Für die Induktion wurde die Konzentration gewählt, bei der die jeweils größte Verlängerung der mittleren Lebenserwartung erzielt wurde (Abb. 27 und 28). Abbildung 30 a zeigt die Kombination aus zwei biologisch unabhängigen Experimenten. Gegenüber der nicht induzierten Kontrolle war die Transkription von *Drosocin* in den mit 0,5 µg/ml Mifepriston induzierten Fliegen um den Faktor 83,6 höher. Abbildung 30 b zeigt die Kombination aus drei biologisch unabhängigen Experimenten. Gegenüber der Kontrolle war die Transkription von *Cecropin A1* in den mit 1 µg/ml Mifepriston induzierten Fliegen um den

Faktor 83,4 höher. Damit lagen die Expressionslevel der AMPs in derselben Größenordnung wie bei der FOXO-abhängigen Induktion in *steppke*-Mutanten.

Nach vier Stunden natürlicher Infektion mit *P. entomophila* über die Nahrung der Fliegen wurde die bakterielle Belastung des Darms mit dem Pathogen bestimmt. Dazu wurden die KFEs von *P. entomophila* aus lysierten Tieren gezählt. Abbildung 30 c zeigt die relative Anzahl von KFEs aus *Drosocin*-überexprimierenden Fliegen gegenüber Kontrollen, wobei zwei biologisch unabhängige Experimente kombiniert wurden. Die Kontrollen sind signifikant um den Faktor 1,5 stärker belastet. In Abbildung 30 d ist die relative Anzahl von KFEs aus *Cecropin A1*-überexprimierenden Fliegen gegenüber Kontrollen dargestellt, wobei zwei biologisch unabhängige Experimente kombiniert wurden. Die Kontrollen waren signifikant um den Faktor 1,78 stärker belastet.

Diese Versuche deuten auf eine positive Auswirkung einer dauerhaften Expression von einzelnen AMPs vor einer natürlichen Infektion im Darm hin. Die so verbesserte lokale Immunabwehr könnte die Ursache für die größere Lebensspanne dieser Tiere sein.

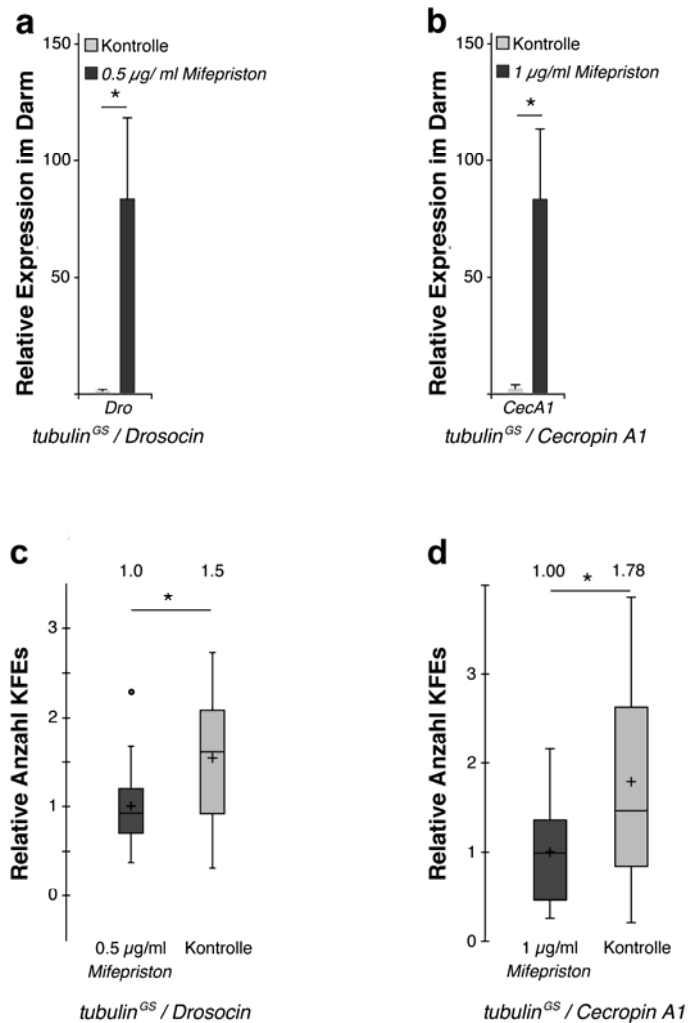


Abbildung 30 Die Expression von Drosocin oder Cecropin A1 führt zu einer verbesserten Immunabwehr. (a) Expressionslevel von Drosocin im Mitteldarm von tubulin^{GS}/Drosocin-Fliegen, induziert mit 0.5 µg/ml Mifepriston. (b) Expressionslevel von Cecropin A1 im Mitteldarm von tubulin^{GS}/Cecropin A1-Fliegen, induziert mit 1 µg/ml Mifepriston. (c) Relative bakterielle Belastung nach natürlicher Infektion mit *P. entomophila*. Vergleich von Fliegen, die Drosocin im tubulin-Muster exprimieren (tubulin^{GS}/Drosocin), mit uninduzierten Kontrollen. (d) Relative bakterielle Belastung nach natürlicher Infektion mit *P. entomophila*. Vergleich von Fliegen, die Cecropin A1 im tubulin-Muster exprimieren (tubulin^{GS}/Cecropin A1), mit uninduzierten Kontrollen. Die Werte in (c und d) sind Mittelwerte für die kolonieformenden Einheiten (KFEs), die Fehlerbalken in (a und b) repräsentieren den SEM. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n -, p - und SEM-Werte sind in den Tabellen 3 und 4 angegeben.

5.5.4 Auswirkung von Keimreduzierung in der Nahrung durch Antibiotika

Die ubiquitäre Überexpression der AMPs *Drosocin* oder *Cecropin A1* in Fliegen des Genotyps tubulin^{GS}-gal4/UAS-*Drosocin* und tubulin^{GS}-gal4/UAS-*Cecropin A1* verbesserte die lokale Immunabwehr im Darm und erhöht die Lebenserwartung von *Drosophila*. Es ist aber noch nicht klar, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Effekten besteht. Sollte

dies der Fall sein, dürfte es durch die Überexpression von AMPs nicht mehr zu einer Verlängerung der Lebensspanne kommen, wenn die Tiere keinen oder sehr wenigen Pathogenen ausgesetzt sind. Um dies zu testen, wurde die Keimzahl im Futter der Fliegen durch eine Kombination von Antibiotika reduziert (Brummel et al., 2004) (Kapitel 4.3.8). In Überlebensexperimenten wurden dann die gleichen Konzentrationen Mifepriston zur Induktion verwendet, die zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne geführt haben (Abb. 27 und 28). Dies waren 0,5 µg/ml und 1 µg/ml Mifepriston für die Induktion von *Drosocin* und 1 µg/ml Mifepriston für die Induktion von *Cecropin A1*. Sowohl das Futter der induzierten Fliegen als auch das Futter der nicht induzierten Kontrollen wurde mit Antibiotika versetzt. Durch die Überexpression von *Drosocin* kam es bei keiner der eingesetzten Mifepriston Konzentrationen zu einer Verlängerung der Lebensspanne gegenüber den Kontrollen (Abb. 31 a-c). Es besteht auch keine signifikante Erhöhung der relativen mittleren Überlebenszeit (Abb. 31 e). Im Fall der Überexpression von *Cecropin A1* war die Lebensspanne gegenüber den Kontrollen sogar signifikant verringert (Abb. 31 d).

Um festzustellen, ob und in welchem Maß eine Überexpression in den induzierten Fliegen erfolgt ist, wurden die Transkriptlevel von *Drosocin* und *Cecropin A1* mit einer quantitativen Real Time PCR in präparierten Mitteldärmen aus jeweils einem Experiment bestimmt. Gegenüber der nicht induzierten Kontrolle war die Transkription von *Drosocin* in den mit 1 µg/ml Mifepriston induzierten *tubulin^{GS}-gal4/UAS-Drosocin*-Fliegen um etwa den Faktor 90 höher (Abb. 31 f). In *tubulin^{GS}-gal4/UAS-Cecropin A1*-Fliegen war die Transkription von *Cecropin A1* in den mit 1 µg/ml Mifepriston induzierten Tieren gegenüber den nicht induzierten Kontrollen um etwa den Faktor 100 höher (Abb. 31 g). Damit liegen die Expressionslevel der AMPs in der selben Größenordnung wie bei Induktion durch Mifepriston ohne Einsatz von Antibiotika, bei denen eine Verlängerung der Lebensspanne nachgewiesen wurde (Abb. 27-30).

Möglicherweise wurde durch die Reduzierung von Keimen in der Lebensumgebung der Fliegen die Wahrscheinlichkeit einer die Lebensspanne beeinträchtigenden Infektion mit Pathogenen so verringert, dass durch die erhöhten Transkriptlevel von *Drosocin* oder *Cecropin A1* kein Überlebensvorteil gegenüber den Kontroll-Tieren mehr bestand.

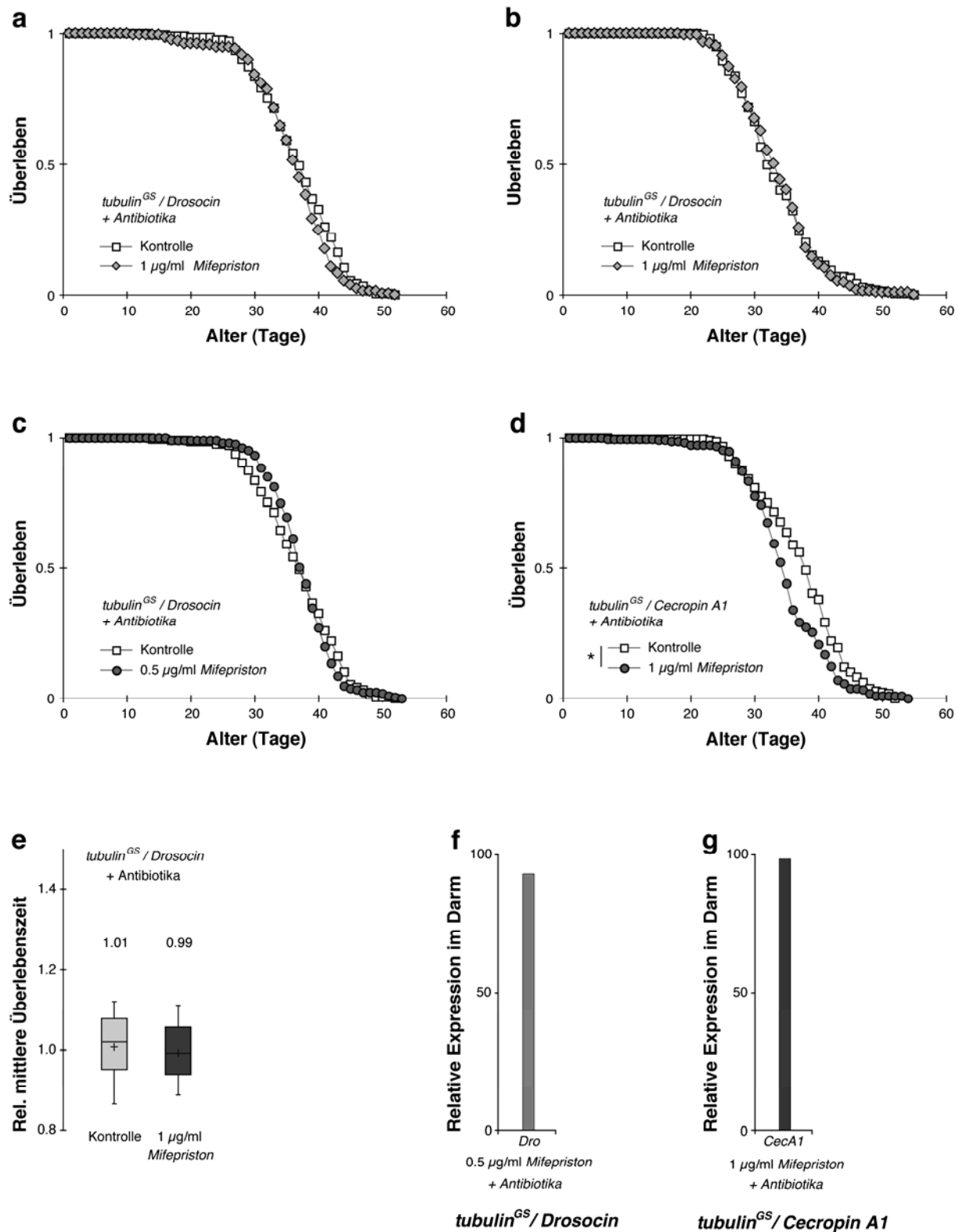


Abbildung 31 Keine Verlängerung der Lebensspanne durch AMP-Expression in keimreduzierter Umgebung. (a) Überlebensexperiment mit *tubulin^{GS}/Drosocin*-Fliegen, gefüttert mit keimreduzierenden Antibiotika mit oder ohne 0.5 µg/ml Mifepriston. (b und c) Überlebensexperimente mit *tubulin^{GS}/Drosocin*-Fliegen, gefüttert mit keimreduzierenden Antibiotika mit oder ohne 1 µg/ml Mifepriston. Zusätzlicher Vergleich mit uninduzierten Fliegen, die auf keimreduziertem Antibiotika-Futter gehalten wurden. (d) Überlebensexperiment mit *tubulin^{GS}/Cecropin A1*-Fliegen, gefüttert mit keimreduzierenden Antibiotika mit oder ohne 1 µg/ml

Mifepriston. (e) Relative mittlere Überlebenszeit der zwei kombinierten unabhängigen Experimente aus (b und c) mit einer Drosocin-Induktion durch 1 µg/ml Mifepriston. (f) Expressionslevel von Drosocin im Mitteldarm von *tubulin^{GS}/Drosocin*-Fliegen, gehalten auf keimreduziertem Futter, induziert mit 0.5 µg/ml Mifepriston. (g) Expressionslevel von Cecropin A1 im Mitteldarm von *tubulin^{GS}/Cecropin A1*-Fliegen, gehalten auf keimreduziertem Futter, induziert mit 1 µg/ml Mifepriston. Die Werte in (e) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n- und p-Werte sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

5.5.5 Darmspezifische Expression von Drosocin

Die Expression einzelner AMP wurde bisher ubiquitär im Muster des Gens *tubulin* induziert. Um zu zeigen, dass allein eine verbesserte lokale Immunabwehr in einem Barriereepithel zu einer verlängerten Lebensspanne führen kann, wurde *Drosocin* mit der durch Mifepriston-induzierbaren Treiberlinie *Tigs2^{GS}-gal4* spezifisch im Darm überexprimiert (Poirier et al., 2008). Abbildung 32 a zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines präparierten Mitteldarms von Fliegen mit dem Genotyp *Tigs2^{GS}-gal4/UAS-gfp*. Als Reporter für das Expressionsmuster der *Tigs2*-Fliegenlinie wurde das Gen *gfp* durch 10 µg/ml Mifepriston im Futter der Fliege induziert. In Blau sind die mit DAPI markierten Zellkerne, in Rot ist das mit Phalloidin markierte Actinzytoskelett und in Grün das über Immunfärbung markierte Reporterprotein GFP dargestellt. Wie schon bei der Induktion im Muster von *tubulin* (Abb. 29) gab es zwei Regionen mit einer deutlich erhöhten Expression. Die erste befand sich im Bereich des hinteren Mitteldarms, die zweite in einem Band um den Proventrikulus, der als immunologisch aktives Organ bekannt ist (Liehl et al., 2006). Die Transkriptlevel von *Drosocin* im Darm von *Tigs2^{GS}-gal4/UAS-Drosocin*-Fliegen nach Induktion mit 10 µg/ml Mifepriston wurden durch eine quantitative Real Time PCR auf präparierte Mitteldärme gemessen. Abb. 32 b zeigt die Kombination von zwei biologisch unabhängigen Experimenten. Die Expression war nach Induktion signifikant um den Faktor 78,7 höher als in den uninduzierten Kontrollen, ähnlich dem Wert 83,6 erzeugt durch Induktion im *tubulin*-Expressionsmuster (Abb. 30).

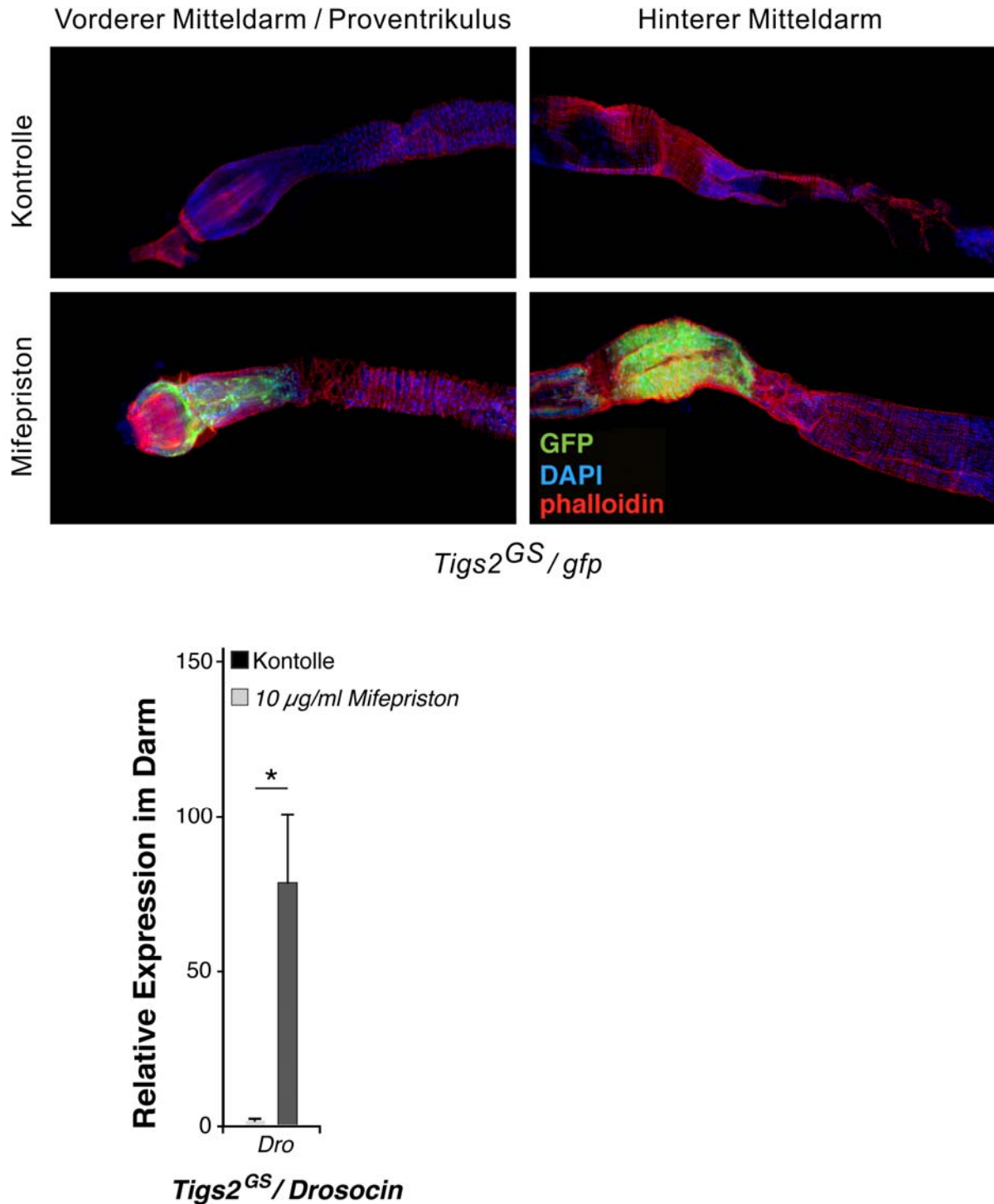


Abbildung 32 Das Muster und die Level der Genexpression im Mitteldarm von *Tigs2^{GS}*-Fliegen. (a) GFP-Expression (grün) im Mitteldarm von *Tigs2^{GS}/gfp*-Fliegen, induziert mit 10 μ g/ml Mifepriston. Aktin wurde mit Phalloidin markiert (rot), die Zellkerne mit DAPI (blau). Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Bereiche mit der stärksten GFP-Reporterexpression. Dies sind der Proventrikulus und eine Region im hinteren Mitteldarm. (b) Expressionslevel von Drosocin im Mitteldarm von *Tigs2^{GS}/Drosocin*-Fliegen, induziert mit 10 μ g/ml Mifepriston. Die Fehlerbalken in (b) repräsentieren den SEM. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n-, p- und SEM-Werte sind in Tabelle 3 angegeben.

5.5.6 Überlebensexperimente und natürliche Infektion nach darmspezifischer Expression von *Drosocin*

Es konnte bereits in Fliegen des Genotyps *Tigs2^{GS}-gal4/UAS-Drosocin* eine darmspezifische *Drosocin*-Expression induziert werden. Ob diese lokale Expression zur Verlängerung der Lebensspanne führt, wurde in Überlebensexperimenten getestet. Die Auswertung der Experimente wurden mit der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt und die Signifikanz der mittleren Überlebenszeit mit einem Student's t-Test bewertet. Abbildung 33 (a-c) zeigt die Ergebnisse der Überlebensexperimente bei Expression von *Drosocin* durch Induktion mit 10 µg/ml Mifepriston. Die Lebensspanne der Tiere gegenüber nicht induzierten Kontrollen war signifikant leicht verlängert. In Abbildung 33 (d) ist die Kombination der relativen mittleren Überlebenszeit der drei Überlebensexperimente zu sehen. Die Differenz der Überlebenszeit gegenüber nicht induzierten Kontrollen war signifikant und lag bei 7 %.

Durch Induktion mit geringeren Mifepriston-Konzentrationen oder durch die Expression von *Cecropin A1* ließ sich die Lebensspanne nicht verlängern (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits bei der Expression von *Drosocin* im *tubulin*-Muster (Abb. 30) konnte auch bei der Expression im *Tigs2*-Muster die lokale Immunabwehr im Darm verstärkt werden.

Fliegen des Genotyps *Tigs2^{GS}-gal4/UAS-Drosocin* wurden vier Stunden natürlich mit *P. entomophila* über die Nahrung infiziert. Anschließend wurde die bakterielle Belastung des Darms mit dem Pathogen durch Zählung der KFEs von *P. entomophila* aus lysierten Tieren gemessen. Abbildung 33 e zeigt die relative Anzahl von KFEs aus Fliegen mit induzierter *Drosocin*-Expression gegenüber nicht induzierten Kontrollen, wobei zwei biologisch unabhängige Experimente kombiniert wurden. Die Kontrollen waren signifikant um den Faktor 1,4 stärker mit *P. entomophila* belastet.

Dies legt den Schluss nahe, dass eine dauerhafte *Drosocin*-Expression über die Lebensspanne der Fruchtfliege positiv auf die lokale Immunabwehr im Darm wirkt. Das könnte ausreichen, um die Lebensspanne dieser Tiere signifikant zu verlängern.

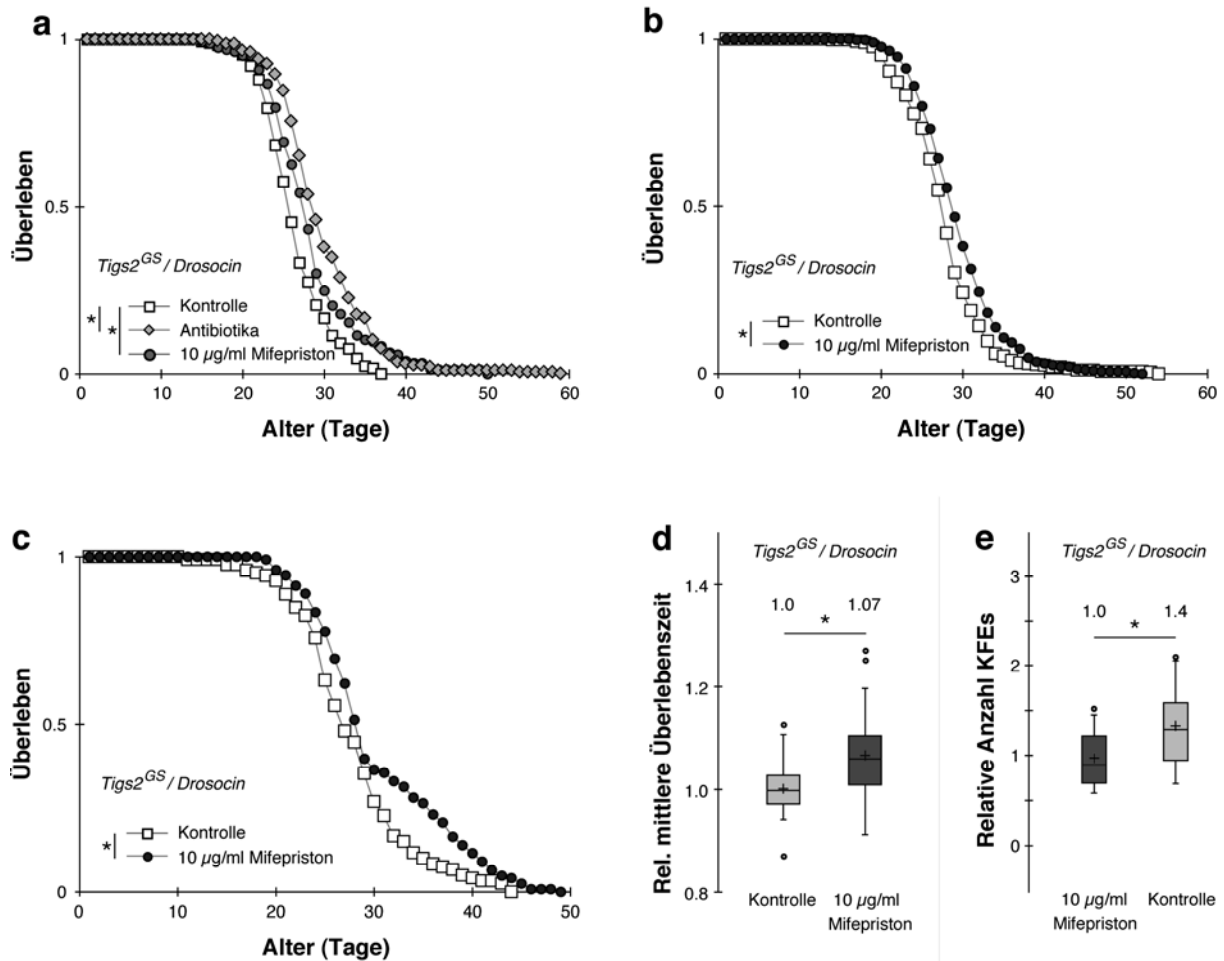


Abbildung 33 Die Expression von Drosocin im Darm verbessert die lokale Immunabwehr und verlängert die Lebensspanne von *Drosophila*. (a-c) Überlebensexperimente mit *Tigs2^{GS}/Drosocin*-Fliegen induziert mit 10 µg/ml Mifepriston im Vergleich zu nicht induzierten Kontrollen. (c) Zusätzlicher Vergleich mit uninduzierten Fliegen, die auf keimreduziertem Antibiotika-Futter gehalten wurden. (d) Relative mittlere Überlebenszeit der drei kombinierten unabhängigen Experimente (a-c). (e) Relative bakterielle Belastung nach natürlicher Infektion mit *P. entomophila*. Vergleich von Fliegen, die Drosocin-induziert mit 10 µg/ml Mifepriston darmspezifisch exprimieren (*Tigs2^{GS}/Drosocin*) mit uninduzierten Kontrollen. Die Werte in (d und e) sind Mittelwerte. Ein Stern bedeutet $p < 0.05$. n- und p-Werte sind in den Tabellen 1, 2 und 4 angegeben.

5.5.7 Keimreduzierung durch Antibiotika

Der Zusammenhang zwischen einer verstärkten Immunabwehr durch ubiquitäre Expression von einzelnen AMPs und einer Verlängerung der Lebensspanne wurde in Kapitel 5.5.1 beschrieben. Um diesen Zusammenhang auch für die Experimente der lokalen Expression von *Drosocin* im Darm der Fruchtfliege nachzuweisen, wurden Überlebensexperimente mit *Tigs2^{GS}-gal4/UAS-Drosocin*-Fliegen mit einer Antibiotikakombination (Kapitel 4.3.8) im Futter von induzierten Tieren und Kontrollen durchgeführt. Durch die Antibiotika wurde die

Keimzahl im Futter der Fliegen reduziert (Brummel et al., 2004). Eine Überexpression von *Drosocin* sollte nun nicht mehr zu einer Verlängerung der Lebensspanne führen. Abbildung 34 a zeigt das Ergebnis eines Überlebensexperimentes bei Expression von *Drosocin* durch Induktion mit 10 µg/ml Mifepriston, ausgewertet durch eine Kaplan-Meier-Analyse. Die Expressionslevel von *Drosocin* sind in Abbildung 34 (b) dargestellt. Die Lebensspanne der Tiere gegenüber Kontrollen wurde durch Induktion des AMPs nicht weiter verlängert.

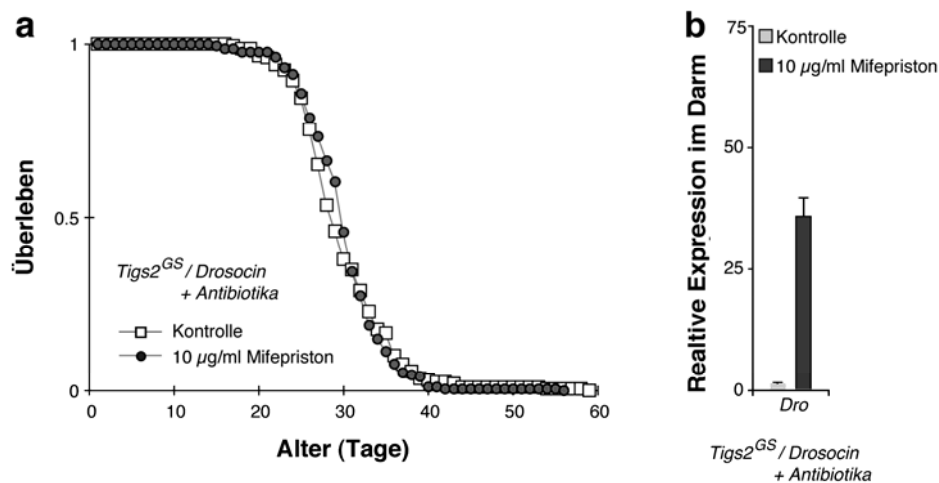


Abbildung 34 In keimreduzierter Umgebung verlängert die darmspezifische Expression von *Drosocin*-Expression die Lebensspanne von *Drosophila* nicht. (a) Überlebensexperiment mit *Tigs2^{GS}/Drosocin*-Fliegen, gefüttert mit keimreduzierenden Antibiotika, induziert mit 10 µg/ml Mifepriston, im Vergleich mit uninduzierten Kontrollen. (b) Expressionslevel von *Drosocin* im Mitteldarm von *Tigs2^{GS}/Drosocin*-Fliegen, gehalten auf keimreduziertem Futter, induziert mit 10 µg/ml Mifepriston. Die Fehlerbalken in (c) repräsentieren den SEM von zwei biologisch nicht unabhängigen Experimenten. *n*- und *p*-Werte sind in Tabelle 1 angegeben.

6 Diskussion

6.1 Verlängerung der Lebensspanne durch Reduktion der Steppke-Funktion

Die Funktion von Steppke als Komponente des IIS wurde bisher vor allem in der Larve untersucht (Fuss et al., 2006). Wie bereits für eine Reihe weiterer Komponenten der Kaskade, z.B. für Chico und den InR (Bohni et al., 1999; Brogiolo et al., 2001) beschrieben, führt die Mutation des *steppke*-Gens zu einer Reduktion der Signalwegsaktivität. Dadurch kommt es zu den beiden IIS-typischen Phänotypen einer larvalen Entwicklungsverzögerung und einem verringerten Größenwachstum, verursacht durch eine reduzierte Zellzahl und -größe im gesamten Organismus. Für die gleichen IIS-Mutanten wird im adulten Stadium eine Verlängerung der Lebensspanne beobachtet, deren Ursache zur Zeit intensiv untersucht wird (Giannakou und Partridge, 2007). Die vorliegende Arbeit charakterisiert die Steppke-Funktion in adulten Fliegen am Beispiel der transheterozygoten *steppke*^{K/SH}-Mutante, bei denen die Transkriptmenge von *steppke* im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen reduziert ist (Fuss et al., 2006), und zeigt die Beteiligung des Gens an der Regulation der Lebensspanne. Homozygote *steppke*-Mutanten, bei denen die *steppke*-Transkription sehr stark reduziert ist, erreichen das adulte Stadium nicht (Fuss et al., 2006). In *steppke*^{K/SH}-Mutanten besteht noch eine Transkriptionsrate des Gens, die zwar die IIS-Aktivität reduziert, sie aber noch zulässt. Diese Aktivität ist für die Fruchtfliege offenbar nötig, um die Metamorphose vom larvalen zum adulten Stadium zu vollziehen.

Aber nicht nur die Reduktion der Genaktivität von *steppke* führt zu dem Phänotyp einer verlängerten Lebensspanne, sondern auch die Inhibition auf Proteinebene durch die niedermolekularen Verbindungen SecinH3 und Secin16. Eine Kombination der transkriptionellen Reduktion von *steppke* und einer funktionellen Inhibition auf Proteinebene durch Fütterung von SecinH3 an *steppke*^{K/SH}-Mutanten hat sogar einen kumulativen Effekt. In adulten *steppke*^{K/SH}-Fliegen liegt die Transkriptionsrate des Gens im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen bei etwa 10 % (Fuss et al., 2006). SecinH3 reduziert vermutlich deutlich die Funktion der verbleibenden Steppke-Proteine und damit auch die IIS-Aktivität. Zumindest auf die Lebensspanne scheint diese weitere, kräftige Reduzierung der IIS-Aktivität einen positiven Effekt auszuüben. Die erzielten Ergebnisse identifizieren Steppke

als weitere Komponente der IIS-Kaskade, die einen Einfluss auf die Regulation der Lebensspanne von *Drosophila* hat.

6.2 Fähigkeiten und Grenzen von Steppke-Inhibitoren der Secin-Klasse

Wie oben diskutiert, kann die Funktion des Cytohesins Steppke nicht nur auf physiologischer oder genetischer Ebene manipuliert werden, sondern auch auf Proteinebene. Dies ist möglich durch den Inhibitor der Sec7-Domäne SecinH3, dessen Funktion und Spezifität für die Bindung an Cytohesine bereits bekannt ist (Becker et al., 2010; Hafner et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von SecinH3 auf die Lebensspanne von adulten *Drosophila* des Stamms *w¹¹¹⁸* gezeigt. Bisher ist eine minimale Konzentration von 10 μ M SecinH3 in der Nahrung nötig, um eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne zu erreichen. Eine Konzentration von 30 μ M hat einen deutlich stärkeren Effekt und liegt mit einer 18%igen Verlängerung der relativen mittleren Überlebenszeit im gleichen Bereich, der auch bei *steppke^{K/SH}*-Mutanten zu sehen ist. Eine Erhöhung der SecinH3-Konzentration ergibt keine weitere Steigerung des Effekts. Dies ist vermutlich auf ein Löslichkeitsproblem der niedermolekularen Verbindung zurückzuführen. SecinH3 ist hydrophob und bisher nur durch DMSO im Fliegenfutter zu lösen. Unter den in dieser Arbeit aufgestellten Bedingungen fallen ab einer Konzentration von 30 μ M große Teile der Verbindung aus und können möglicherweise nicht mehr von den Fliegen aufgenommen werden. Der bereits diskutierte kumulative Effekt von SecinH3 in *steppke^{K/SH}*-Mutanten deutet aber darauf hin, dass eine weitere Reduktion der Steppke-Funktion durch eine höhere SecinH3-Aufnahme zu einer weiteren Verlängerung der Lebensspanne führen könnte. Die Stärke des phänotypischen Effekts durch die Wirkung von SecinH3 scheint vom untersuchten *Drosophila*-Stamm abzuhängen, wie die Experimente in wildtypischen *Oregon^R*-Fliegen zeigen. Hier ist der Effekt mit einer signifikanten Steigerung der relativen mittleren Überlebenszeit von 6 % geringer.

Die in einem virtuellen Screening identifizierte niedermolekulare Verbindung Secin16 bestätigte sich in drei verschiedenen In-vitro-Experimenten als besonders wirksame SecinH3-Alternative (Stumpfe et al., 2010). In einem *Drosophila*-S2-Zellkulturexperiment bewirkt Secin16 gegenüber SecinH3 und den anderen getesteten Kandidaten die weitaus

stärkste Blockierung der IIS-Aktivität. Die Verlängerung der Lebensspanne ist bei Fütterung von Secin16 etwas größer, hat aber beim Einsatz höherer Konzentrationen keinen stärkeren Effekt auf die Lebensspanne (Daten nicht gezeigt) – vermutlich auf Grund einer noch schlechteren Löslichkeit als SecinH3. Dennoch ist Secin16 eine interessante Alternative für SecinH3 und eignet sich möglicherweise in anderen experimentellen Ansätzen oder biologischen Fragestellungen besser.

Die hier diskutierten Experimente zeigen, dass Secin-Verbindungen in der Lage sind, die IIS-Aktivität zu reduzieren und die Lebensspanne von *Drosophila* deutlich zu verlängern. Diese Wirkung ist wahrscheinlich abhängig von der Fähigkeit der Verbindungen, die Sec7-Domäne von Steppke zu inhibieren. Es lässt sich aber nicht ausschließen, dass Secin-Verbindungen auch auf andere Proteine und Signalwege wirken, die ebenfalls die Lebensspanne von *Drosophila* beeinflussen. Darauf weisen Ergebnisse in murinen Zellen hin, in denen SecinH3 einen Einfluss auf den EGF (Epidermal Growth Factor)-Signalweg hat (Bill et al., 2011). Für die weitere Erforschung des Mechanismus der FOXO-abhängigen Regulation des Immunsystems und der Lebensspanne wurde deshalb auf die Verwendung dieser Inhibitoren verzichtet. Diese Inhibitoren können jedoch durchaus interessante Werkzeuge zum Eingriff in den IIS sein und sich besonders für Untersuchungen in Organismen eignen, in denen eine genetische Manipulation nicht möglich ist. Denkbar ist auch eine zukünftige therapeutische Rolle bei IIS-assozierten Erkrankungen.

6.3 Die Regulation der Lebensspanne in *steppke*-Mutanten ist FOXO-abhängig

Der Mechanismus hinter der Verlängerung der Lebensspanne über den IIS ist bisher nicht aufgeklärt. Obwohl für viele der Funktionen des IIS, wie z.B. die Regulation der Energiehomöostase oder der zellulären Stressantwort, ein Einfluss auf die Lebensspanne diskutiert wird, war bisher kein Mechanismus experimentell nachzuweisen (Giannakou und Partridge, 2007). Wie bereits diskutiert, ist der Transkriptionsfaktor FOXO ein evolutionär konservierter Schlüsselregulator, über den auch der IIS viele seiner Funktionen zumindest teilweise vermittelt (Arden, 2008). Dazu gehört der phänotypische Effekt der Langlebigkeit, wie Versuche in verschiedenen Modellorganismen zeigen (Giannakou und Partridge, 2007). Die Überexpression von *foxo* in adulten *Drosophila*, die eine Aktivierung von FOXO über den

IIS simuliert, führt zu einer verlängerten Lebensspanne (Hwangbo et al., 2004). Zu dem gleichen Ergebnis führt auch die Überexpression des *foxo*-Homologs *daf-16* in *C. elegans* (Kenyon et al., 1993). Darüber hinaus finden sich zwei weitere Beispiele für den Zusammenhang zwischen Langlebigkeit und der FOXO-Funktion in der Maus und im Menschen: Die langlebigen Knock-out Mäuse des *IRS* weisen eine erhöhte FOXO1-Aktivität auf (Selman et al., 2008; Taguchi et al., 2007; Taguchi und White, 2008) und in langlebigen menschlichen Populationen wurde eine Korrelation mit genetischen Variationen des *foxo3A*-Gens entdeckt (Flachsbar et al., 2009; Willcox et al., 2008).

In *C. elegans* sind alle bisher beschriebenen physiologischen Effekte einer reduzierten IIS-Aktivität abhängig von der Funktion von DAF-16 (Kenyon et al., 1993). In *Drosophila* gibt es Hinweise dafür, dass hier nur ausschließlich die Regulation der Lebensspanne vom Transkriptionsfaktor FOXO abhängt. Deshalb wird die Regulation der Körpergröße, der Fruchtbarkeit und der zellulären oxidativen Stressresistenz in den *foxo*-Nullmutanten nicht unterdrückt. Eine Verlängerung der Lebensspanne ist in diesen *foxo*-Nullmutanten über die Reduktion des IIS nicht zu erreichen, alle anderen physiologischen Effekte können aber offenbar auch ohne FOXO vermittelt werden (Slack et al., 2011). Dies ist in Einklang mit dem Ergebnis dieser Arbeit, dass eine Reduktion der IIS-Aktivität durch Inhibition von Steppke in *foxo*^{21/W24}-Mutanten mit SecinH3 nicht zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt. Beide Ergebnisse machen unabhängig sichtbar, dass die IIS-vermittelte Regulation der Lebensspanne auf die Funktion von FOXO angewiesen ist. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse - auch in anderen Organismen - würde die Suche nach der Ursache für den Einfluss, den der IIS auf die Lebensspanne hat, noch stärker auf FOXO und FOXO-abhängige Faktoren begrenzen. Auf jeden Fall hat sich erhärtet, dass der Transkriptionsfaktor ein vielversprechender Kandidat für die Regulation von Genen ist, die einen Einfluss auf die Lebensspanne von *Drosophila* haben. Die Gruppe der AMP-Gene, deren direkte Regulation durch FOXO in dieser Arbeit untersucht wird, könnte einen solchen Einfluss haben.

6.4 Die Regulation des Immunsystems in IIS-Mutanten ist FOXO-abhängig

AMPs bilden eine funktionelle Gruppe von evolutionär konservierten Haupteffektormolekülen des angeborenen Immunsystems und werden sogar von Pflanzen

zum Schutz vor pathogenen Mikroorganismen eingesetzt (Bulet et al., 2004). Wie bereits dargelegt, kann ihre Transkription in *Drosophila* direkt von FOXO induziert werden - unabhängig von einer Infektion. Dabei lässt sich die Regulation sowohl in Larven wie auch in adulten Fliegen durch den IIS steuern, was sich durch Reduzierung des IIS auf Gen- und Proteinebene sowie durch Hungern demonstrieren lässt. Bisher wurde nur die Aktivierung durch den IIS untersucht, aber die Regulation durch den multifunktionalen Schlüsselfaktor FOXO legt nahe, dass auch weitere Einflüsse und Signalwege, wie z.B. zellulärer Stress, auf diesen Mechanismus wirken.

Es besteht allerdings keine Kreuzregulation mit den klassischen Immunsignalwegen Toll und IMD, welche die AMP-Expression bei einer Infektion aktivieren. Experimente in Doppelmutanten der beiden Signalwege belegen, dass die FOXO-abhängige AMP-Induktion weiterhin möglich ist, aber eine Infektion keine transkriptionelle Aktivierung der AMPs mehr zur Folge hat. Dagegen ist die infektionsabhängige Aktivierung in *foxo*^{21/W24}-Mutanten nicht gestört. Dieser FOXO-Mechanismus ist zellautonom und wirkt in vielen Geweben, wie Hungerexperimente im larvalen Stadium von *Drosophila* zeigen. Unter den untersuchten Geweben finden sich auch die beiden metabolisch und immunologisch wichtigsten Organe von *Drosophila*, nämlich der Fettkörper und der Darm.

Diese gerade diskutierten Ergebnisse wurden in (Becker et al., 2010) gezeigt und deuten auf einen direkt FOXO-abhängigen Mechanismus der Kreuzregulation von Metabolismus und Immunsystem hin, mit dem Zellen, Organe oder der gesamte Organismus infektionsunabhängig AMPs regulieren können. Experimente in muriner und humaner Zellkultur weisen auf eine evolutionäre Konservierung des Mechanismus in Säugetieren hin.

6.5 Direkte Regulation von AMPs durch FOXO

In *Drosophila*-Mutanten der Gene *steppke* und *chico*, Komponenten der IIS-Kaskade, sind mehrere AMPs transkriptionell induziert. Die Induktion findet dabei sowohl im larvalen als auch im adulten Stadium statt. Abhängig von dem Entwicklungsstadium der Fruchtfliegen und dem untersuchten Gewebe wird immer ein Teil aller AMPs exprimiert. Auffällig ist dabei die unter vielen Bedingungen sehr starke Induktion von *Drosomycin* in Larven. In adulten *Drosophila* scheint keine Regulation von *Drosomycin* durch FOXO stattzufinden. In

wildtypischen Fruchtfliegen lässt sich die transkriptionelle Aktivierung der AMPs auch durch Hungern oder durch Füttern der Tiere mit dem Steppke-Inhibitor SecinH3 hervorrufen (Becker et al., 2010). In *foxo*^{21/W24}-Mutanten ist diese Aktivierung nicht möglich, ein Beweis der Abhängigkeit dieser IIS-induzierten Expression von dem Transkriptionsfaktor. Die Überexpression von *foxo* ohne weitere Einflussnahme auf den IIS führt ebenfalls zu einer Induktion von AMPs, was die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors in diesem Mechanismus unterstreicht (Becker et al., 2010). Auch in *C. elegans* wird eine von DAF-16, dem Nematoden-Homolog von FOXO, abhängige AMP-Induktion beobachtet (Murphy et al., 2003). FOXO ist ein hoch konservierter Schlüsselregulator, den viele Signalwege nutzen, um Prozesse wie die Energiehomöostase oder die Verarbeitung von zellulärem Stress zu beeinflussen. In *Drosophila* wurde seine Fähigkeit, AMPs zu induzieren, bisher nur für die Regulation über den IIS beschrieben (Becker et al., 2010).

Eine wichtige Frage ist, ob die AMP-Regulation direkt oder indirekt von FOXO abhängt. Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor über seine Forkhead-Box-Domäne an entsprechenden, konservierten FOXO/Forkhead-Bindemotiven direkt mit der DNA interagieren kann (Xuan und Zhang, 2005). Eines oder mehrere dieser Bindemotive finden sich in den regulatorischen Regionen fast aller AMPs, ein Hinweis auf eine direkt FOXO-abhängige Regulation (Becker et al., 2010). In der Promotorregion von *Drosomycin* befinden sich fünf dieser Bindemotive. Dies erklärt die beobachtete, starke Induktionsfähigkeit dieses AMPs und hat die Auswahl dieses Promotors für die experimentelle Untersuchung der FOXO-Bindung bestimmt. Electromobility Shift Assay (EMSA)-Daten beweisen, dass das FOXO-Protein direkt an die DNA der Promotorregion von *Drosomycin* bindet (Becker et al., 2010).

Experimente dieser Arbeit haben offengelegt, dass für diese Bindung die FOXO/Forkhead-Box-Bindemotive erforderlich sind. Verschiedene *Drosomycin*-Promotorkonstrukte, bei denen entweder das gesamte FOXO/Forkhead-Box-Bindemotiv-Cluster fehlt oder aber einzelne bzw. Kombinationen von Bindemotiven mutiert sind, zeigen in S2-Zellkultur eine Reduktion oder den Verlust der Fähigkeit, auf eine Induktion durch FOXO zu reagieren.

6.6 FOXO wirkt über die Immunabwehr auf die Lebensspanne

Das Immunsystem und der Alterungsprozess stehen in einer wechselseitigen Beziehung und bestimmen damit gemeinsam die Lebensspanne eines Organismus.

Auf der einen Seite ist bekannt, dass das angeborene, vor allem aber das adaptive Immunsystem altert, was man unter dem Begriff "Immunosenescence" zusammenfasst (Gomez et al., 2008; Sansoni et al., 2008). Dieser Vorgang, besonders gut bei Säugetieren untersucht, führt nicht nur zu einer verschlechterten Immunabwehr, sondern fördert auch chronisch-entzündliche Erkrankungen, ausgelöst durch Fehlfunktionen des adaptiven Immunsystems selbst. Beispiele für solche Erkrankungen sind die Arteriosklerose des Gefäßsystems und eine Reihe entzündlicher Erkrankungen des Darms (Xavier und Podolsky, 2007). Auf der anderen Seite ist klar, dass das Immunsystem Infektionen und andere Krankheiten verhindern kann, die entweder direkt zum Tod führen oder durch sekundäre Effekte den Organismus schädigen und damit Einfluss auf das Altern und die Lebensspanne ausüben (Alper, 2010). Es liegt damit nahe, dass Mechanismen für die Regulation der Lebensspanne unter anderem auf das Immunsystem einwirken, um die Lebensspanne zu verlängern.

Wie bereits angeführt, hat der IIS eine konservierte Rolle in der Regulation der Lebensspanne und über den Transkriptionsfaktor FOXO einen direkten Einfluss auf das Immunsystem. In *C. elegans* gibt es zwei Signalwege, die sowohl die Lebensspanne als auch die Immunabwehr regulieren. Bei dem ersten handelt es sich um den DAF-2-Signalweg, dem Nematoden-Homolog des IIS (Kenyon et al., 1993). Mutationen der beiden Kaskadenkomponenten *daf-2* und *age-1* führen jeweils zu einer starken Verlängerung der Lebensspanne und gleichzeitig zu einer höheren Überlebensrate bei oraler Infektion mit den bakteriellen Pathogenen *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* (Garsin et al., 2003). Der zweite ist der sogenannte Germline-Signalweg, dessen Inaktivierung sowohl eine Verlängerung der Lebensspanne als auch eine bessere Resistenz gegenüber einer Infektion, z.B. mit *P. aeruginosa*, bewirkt (Alper et al., 2010; Arantes-Oliveira et al., 2002; Evans et al., 2008a).

Der Germline-Signalweg ist bei der Verlängerung der Lebensspanne vollständig abhängig von der Funktion des Transkriptionsfaktors DAF-16. Der DAF-2-Signalweg ist bei beiden phänotypischen Effekten auf die Funktion von DAF-16 angewiesen (Alper, 2010). In *C.*

elegans supprimiert das Pathogen *P. aeruginosa* sogar die Expression von immunologischen Effektormolekülen durch DAF-16, in dem es den DAF-2-Signalweg aktiviert (Evans et al., 2008b).

In *Drosophila* weisen langlebige *chico*-Mutanten eine erhöhte Überlebensrate bei einer systemischen Infektion mit *Enterococcus faecalis* auf (Libert et al., 2008). Ein Einfluss der IIS-induzierten AMP-Transkription auf den Verlauf der Infektion wird in dieser Studie ausgeschlossen. Dies könnte durch die gewählte unnatürliche und massive Art der systemischen Infektion mit einem Humanpathogen begründet sein. (Libert et al., 2008). Auch in eigenen Experimenten (Daten nicht gezeigt) führt eine FOXO-induzierte Expression von AMPs nicht zu einer verbesserten Immunabwehr im Fall einer systemischen Infektion mit verschiedenen Bakterienspezies.

Die bisher dargelegten Erkenntnisse scheinen eine evolutionär konservierte Funktion von FOXO bei der Verlängerung der Lebensspanne über die Regulation der Immunabwehr zu belegen. Die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Idee. Als Modell für ein Barriereepithel, das sowohl wichtige metabolische wie auch immunologische Funktionen erfüllt, wurde der Mitteldarm von *Drosophila* gewählt, um den Einfluss der FOXO-abhängigen Regulation von AMPs auf die Immunabwehr und die Lebensspanne der Tiere zu untersuchen. Durch diese Regulation kommt es in *steppke*^{K/SH}-Mutanten im larvalen Stadium (Becker et al., 2010) ebenso wie im Mitteldarm der langlebigen adulten Tieren zu einer transkriptionellen Induktion von AMPs. Ein sehr ähnliches Transkriptionsprofil ist in Mitteldarm von Tieren zu sehen, bei denen *foxo* im darmspezifischen Muster der *caudal*-Expression überexprimiert wird.

In beiden Fällen zeigen die Fliegen eine verbesserte Resistenz gegen eine natürliche orale Infektion mit dem aus wildtypischen Tieren isolierten *Drosophila*-Pathogen *P. entomophila*. Bewertet wird die Resistenz durch die Messung der bakteriellen Belastung des Darms mit dem Pathogen nach der Infektion. Bekannt ist, dass die Bekämpfung von *P. entomophila* ausschließlich vom lokalen Immunsystem des Darms abhängt. Die Bakterien breiten sich in der Regel nur im Darm aus und entfalten dort ihre pathogene Wirkung (Vodovar et al., 2005) (Liehl et al., 2006). Die verbesserte Resistenz gegen die Infektion mit dem virulenten Bakterium *E. carotovora* 15, das ebenfalls aus *Drosophila* isoliert wurde, schließt einen Bakterienspezies-spezifischen Effekt der verbesserten Resistenz aus (Liehl et al., 2006).

Diese Ergebnisse bestätigen das Modell der Verlängerung der Lebensspanne über eine FOXO-abhängige Verbesserung der Immunabwehr und lassen auf eine Beteiligung der direkten AMP-Induktion durch FOXO schließen. Die Frage, ob die beiden Effekte der Regulation der Lebensspanne und der Immunabwehr in einem kausalen Zusammenhang stehen, bleibt weiterhin offen.

6.7 AMPs führen zur Verlängerung der Lebensspanne

In *Drosophila* sind hunderte Zielgene des FOXO-Transkriptionsfaktors bekannt, darunter einige des angeborenen Immunsystems. Der Nachweis ihres Einflusses auf die Lebensspanne fehlt jedoch bisher (Alic et al., 2011). Wie bereits gesagt, sind Gene der Gruppe der AMPs vielversprechende Kandidaten für einen solchen direkten Einfluss. Ihre dauerhafte Expression im Muster von *tubulin* und damit auch im Darm von adulten Fliegen kann zu einer Verlängerung der Lebensspanne führen. Für die AMPs *Drosocin* und *Cecropin A1* ist in dieser Arbeit eine leichte aber signifikante Verlängerung zu erkennen. Auch die Expression von *Drosocin* ausschließlich im Darm der Tiere im Muster von *Tigs2*-Fliegen führt zu einem signifikanten positiven Effekt auf die Lebensspanne. Die Induktion der Transkriptlevel der AMPs im Darm liegt in beiden Fällen in der Größenordnung der AMP-Induktion durch FOXO-Expression oder in den langlebigen *steppke*^{K/SH}-Mutanten. Mit einem Mifepriston-induzierbaren System lassen sich die Transkriptlevel variieren. Einen positiven Effekt auf die Lebensspanne haben sie aber nur in einem sehr engen Rahmen. Sowohl bei einer stärkeren, als auch einer schwächeren Induktion der einzelnen AMPs ist kein signifikanter Einfluss mehr festzustellen. Für die verwendeten Mifepriston-Konzentrationen ist in Kontrolltieren keine Änderung der Lebensspanne zu messen (Daten nicht gezeigt) oder in der Literatur beschrieben. Mit der Expression anderer AMPs war bisher noch kein Effekt zu erzielen, ist aber bei der richtigen Einstellung der Transkriptionslevel denkbar. Außerdem ist eine kombinierte Expression von AMPs eine aussichtsreiche Chance, die Lebensspanne weiter zu verlängern.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Regulation einzelner AMPs einen Einfluss auf die Lebensspanne von *Drosophila* hat. Allein die Regulation im Barriereepithel des Darms reicht aus, um diesen Effekt zu erhalten. Ein Teil der beobachteten FOXO-abhängigen

Lebensverlängerung in IIS-Mutanten könnte daher auf den Einfluss von AMPs zurückgehen. Es stellt sich die Frage, ob die beschriebene Funktion der AMPs als Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems (Lemaitre und Hoffmann, 2007) die Ursache für die Verlängerung der Lebensspanne ist. Darauf deutet hin, dass in den gerade diskutierten Experimenten die Expression der beiden AMPs *Drosocin* und *Cecropin A1* nach natürlicher Infektion mit *P. entomophila* zu einer signifikanten Verringerung der Belastung der Tiere mit dem Pathogen führt. Die AMPs sind also in der Lage, bei einzelner Expression - selbst bei den relativ gering induzierten Transkriptleveln - vor einer Infektion einen positiven Einfluss auf deren Verlauf zu nehmen. Für beide AMPs ist ihre Wirksamkeit gegen gram-negative Bakterien in Infektionsversuchen mit *P. entomophila* und anderen Spezies nachgewiesen (Liehl et al., 2006; Tzou et al., 2000; 2002).

Führt man alle hier diskutierten Überlebensexperimente auf keimreduziertem Futter mit Antibiotika durch (Brummel et al., 2004), bewirkt die Induktion der AMPs in keinem Fall mehr eine Verlängerung der Lebensspanne. Die Antibiotika verringern die Belastung mit Pathogenen und auch *P. entomophila* ist nicht in der Lage, auf diesem Futter zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Die Antibiotika reduzieren aber auch deutlich die kommensale Mikroflora der Fliegen (Ren et al., 2007) (Daten nicht gezeigt). Dennoch hat die Verwendung von Antibiotikafutter bei diesen experimentellen Bedingungen eine Verlängerung der Lebensspanne zur Folge. Eine Induktion von *Drosocin* oder *Cecropin A1* hat jedoch keinen weiteren positiven Einfluss mehr. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AMPs ihren Einfluss auf die Lebensspanne von *Drosophila* über ihre Wirkung auf Pathogene ausüben.

6.8 Modell

Die Ergebnisse dieser Arbeit begründen eine Modell einer FOXO-abhängigen Regulation der Lebensspanne von *Drosophila* über die direkte Expressionskontrolle von AMPs. Damit wird ein Mechanismus vom Beginn einer Signalkaskade bis zur Wirkung seiner durch ihn regulierten Effektormoleküle beschrieben und damit ein Teil der bekannten Kontrolle der Lebensspanne durch den IIS und FOXO erklärt.

Signalwege wie der IIS können nach diesem Modell, abhängig vom physiologischen Status des Organismus, über die Expression von AMPs - durch die direkte Bindung des

Transkriptionsfaktors FOXO an deren Promotor - die Immunabwehr stärken. Dies findet unabhängig von den klassischen Immunsignalwegen und vor allem in Barriereepithelien wie dem Darm statt, die in ständigem Kontakt mit Mikroorganismen stehen. Durch diese konstante und moderate Aktivierung der AMPs sind die Barriereepithelien auf potentielle Infektion vorbereitet und bieten dem Organismus die Möglichkeit, diese erfolgreicher zu bekämpfen. Über die gesamte Lebensspanne der Tiere betrachtet, verringert dieser Mechanismus so die Wahrscheinlichkeit einer pathogenen Infektion und führt damit zu einer Verlängerung der Lebensspanne.

7 Statistik

7.1 Tabelle 1 Überlebensexperimente

Abb.	Stichprobe A	Fliegen ± A	Stichprobe B	Fliegen ± B	p-Wert †
13 a	Kontrolle	109 (0)	<i>steppke</i>	99 (0)	< 0.0001
13 b	Kontrolle	201 (0)	<i>steppke</i>	194 (0)	< 0.0001
14 a	Kontrolle	343 (0)	Secin 10	322 (0)	0.0013
14 b	Kontrolle	112 (0)	Secin 10	111 (0)	0.1515
14 c	Kontrolle	109 (0)	Secin 10	107 (0)	0.0111
15 a	<i>steppke</i>	194 (0)	<i>steppke</i> + Secin 30	106 (0)	< 0.0001
15 b	<i>steppke</i>	99 (0)	<i>steppke</i> + Secin 30	100 (0)	< 0.0001
16 a	Kontrolle	112 (0)	Secin 30	220 (1)	< 0.0001
16 b	Kontrolle	206 (9)	Secin 30	194 (14)	< 0.0001
16 c	Kontrolle	141 (12)	Secin 30	313 (20)	< 0.0001
16 c	Kontrolle	141 (12)	Secin 90	202 (13)	< 0.0001
17 a	Oregon	216 (0)	Secin 30	199 (2)	0.0003
17 c	Kontrolle	112 (0)	D5	98 (0)	0.0638
18 a	<i>foxo</i>	192 (22)	<i>foxo</i> + Secin 30	192 (18)	0.7944
18 b	<i>foxo</i>	174 (0)	<i>foxo</i> + Secin 30	179 (0)	0.7624
18 c	<i>foxo</i>	214 (0)	<i>foxo</i> + Secin 30	212 (1)	0.5554
26 a	Kontrolle	213 (9)	Mifepriston	205 (13)	0.0065
26 b	Kontrolle	107 (4)	Mifepriston	104 (5)	0.0001
26 c	Kontrolle	209 (11)	Mifepriston	183 (26)	< 0.0001
26 c	Kontrolle	209 (11)	Antibiotika	205 (12)	< 0.0001
26 d	Kontrolle	213 (9)	Mifepriston	206 (13)	0.3797
26 e	Kontrolle	209 (11)	Mifepriston	197 (24)	< 0.0001
26 f	Kontrolle	107 (4)	Mifepriston	107 (5)	0.0003
27 c	Kontrolle	92 (13)	Mifepriston	100 (13)	0.1924
27 d	Kontrolle	107 (4)	Mifepriston	93 (6)	0.4090
28 a	Kontrolle	213 (8)	Mifepriston	207 (10)	0.0186
28 b	Kontrolle	181 (10)	Mifepriston	212 (10)	0.0202
28 b	Kontrolle	181 (10)	Antibiotika	206 (13)	< 0.0001

31 a	Kontrolle	205 (12)	Mifepriston	209 (12)	0.0889
31 b	Kontrolle	205 (8)	Mifepriston	210 (11)	0.9495
31 c	Kontrolle	205 (12)	Mifepriston	207 (11)	0.6976
31 d	Kontrolle	206 (13)	Mifepriston	209 (10)	0.0001
33 a	Kontrolle	173 (1)	Mifepriston	162 (7)	0.0001
33 a	Kontrolle	173 (1)	Antibiotika	198 (20)	< 0.0001
33 b	Kontrolle	431 (2)	Mifepriston	426 (7)	< 0.0001
33 c	Kontrolle	120 (10)	Mifepriston	122 (11)	0.0028
34 a	Kontrolle	198 (20)	Mifepriston	200 (23)	0.9354

* Mittelwert der relativen Expression und Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

† Einseitiger Student's t-Test für Stichproben ungleicher Varianz

7.2 Tabelle 2 Relative mittlere Überlebenszeit

Abb.	Stichprobe A	$n(x)$ A ‡	Mw A *	SEM A *	Stichprobe B	$n(x)$ B ‡	Mw B *	SEM B *	p-Wert †
13 c	Kontrolle	15 (2)	1.00	0.026	<i>steppke</i>	15 (2)	1.20	0.025	< 0.0001
14 d	Kontrolle	31 (4)	1.00	0.011	Secin 10	30 (4)	1.07	0.015	< 0.0001
15 c	Kontrolle	15 (2)	1.00	0.026	<i>steppke</i> + Secin 10	15 (2)	1.37	0.027	< 0.0001
15 c	Kontrolle	15 (2)	1.00	0.026	<i>steppke</i>	15 (2)	1.20	0.025	< 0.0001
16 d	Kontrolle	21 (3)	1.00	0.019	Secin 30	34 (3)	1.24	0.020	< 0.0001
16 d	Kontrolle	7 (1)	1.00	0.024	Secin 90	10 (1)	1.24	0.035	< 0.0001
17 b	<i>Oregon^R</i>	30 (3)	1.00	0.014	<i>Oregon^R</i> + Secin 30	29 (3)	1.07	0.014	0.0007
17 d	Kontrolle	5 (1)	1.00	0.039	D5	5 (1)	0.93	0.066	0.8150
18 d	<i>foxo</i>	28 (3)	1.00	0.020	<i>foxo</i> + Secin 30	28 (3)	1.02	0.018	0.2600
27 a	Kontrolle	25 (3)	1.00	0.012	Mifepriston	25 (3)	1.11	0.016	< 0.0001
27 b	Kontrolle	25 (3)	1.00	0.012	Mifepriston	25 (3)	1.08	0.015	0.0001
28 c	Kontrolle	19 (2)	1.00	0.010	Mifepriston	20 (2)	1.06	0.010	< 0.0001
31 e	Kontrolle	10 (1)	1.00	0.022	Mifepriston	10 (1)	1.01	0.015	0.3648
31 e	Kontrolle	20 (2)	1.01	0.018	Mifepriston	20 (2)	0.99	0.016	0.7347
33 d	Kontrolle	34 (3)	1.00	0.008	Mifepriston	34 (3)	1.07	0.014	< 0.0001

‡ Anzahl der experimentellen Gruppen (n) aus x unabhängigen Experimenten

* Mittelwert der relativen mittleren Überlebenszeit und Standardfehler (SEM) des Mittelwertes (Mw)

† Einseitiger Student's t-Test für Stichproben mit ungleicher Varianz

7.3 Tabelle 3 Quantitative Real Time PCR

Abb.	Gen	Stichprobe A	Mw A *	SEM A *	Stichprobe B	Mw B *	SEM B *	p-Wert †
21 (n = 3)	<i>AttA</i>	Kontrolle	1.0	0.24	<i>steppke</i>	116.4	6.06	0.0014
	<i>Dro</i>	Kontrolle	1.0	0.47	<i>steppke</i>	563.3	287.00	0.0946
	<i>CecA1</i>	Kontrolle	1.4	0.61	<i>steppke</i>	25.0	5.50	0.0243
	<i>CecC</i>	Kontrolle	1.5	1.27	<i>steppke</i>	23.7	6.70	0.0158
	<i>Def</i>	Kontrolle	1.4	0.50	<i>steppke</i>	40.1	30.84	0.1682
	<i>Dpt</i>	Kontrolle	2.2	0.98	<i>steppke</i>	10.9	7.60	0.1275
	<i>Drs</i>	Kontrolle	2.2	1.33	<i>steppke</i>	3.0	2.29	0.3823
	<i>Mtk</i>	Kontrolle	2.3	1.16	<i>steppke</i>	2.7	2.43	0.4392
23 (n = 3)	<i>foxo</i>	<i>caudal</i>	1.0	0.10	<i>caudal / foxo</i>	12.3	1.78	0.0015
	<i>AttA</i>	<i>caudal</i>	1.0	0.39	<i>caudal / foxo</i>	239.3	76.22	0.0229
	<i>Dro</i>	<i>caudal</i>	1.0	0.42	<i>caudal / foxo</i>	94.7	47.49	0.0782
	<i>CecA1</i>	<i>caudal</i>	1.0	0.67	<i>caudal / foxo</i>	1.1	0.29	0.4592
	<i>CecC</i>	<i>caudal</i>	1.0	0.81	<i>caudal / foxo</i>	1.5	0.59	0.3304
	<i>Def</i>	<i>caudal</i>	1.0	0.21	<i>caudal / foxo</i>	4.4	1.55	0.0635
	<i>Dpt</i>	<i>caudal</i>	1.0	0.23	<i>caudal / foxo</i>	4.6	1.69	0.0660
	<i>Drs</i>	<i>caudal</i>	1.0	0.57	<i>caudal / foxo</i>	1.2	0.58	0.3947
	<i>Mtk</i>	<i>caudal</i>	1.0	0.28	<i>caudal / foxo</i>	0.9	0.62	0.5297
30 a (n = 2)	<i>Dro</i>	Kontrolle	1.2	0.69	Mifepriston	83.6	34.93	0.1276
30 b (n = 3)	<i>CecA1</i>	Kontrolle	2.1	1.60	Mifepriston	83.4	30.08	0.0034
32 (n = 4)	<i>Dro</i>	Kontrolle	1.3	0.55	Mifepriston	78.7	22.02	0.0063

* Mittelwert der relativen Expression und Standardfehler (SEM) des Mittelwertes (Mw)

† Einseitiger Student's t-Test für Stichproben ungleicher Varianz

7.4 Tabelle 4 Bakterielle Belastung

Abb.	Stichprobe A	$n(x)$ A ‡	Mw A *	SEM A *	Stichprobe B	$n(x)$ B ‡	Mw B *	SEM B *	p-Wert †
22	<i>steppke</i>	29 (4)	1.0	0.07	Kontrolle	29 (4)	2.2	0.26	< 0.0001
					<i>caudal</i>	15 (2)	1.6	0.12	< 0.0001
24 a	<i>caudal / foxo</i>	48 (6)	1.0	0.08	<i>foxo</i>	12 (2)	1.4	0.10	0.0081
					<i>foxo / CyO</i>	18 (2)	2.1	0.33	< 0.0001

24 b	<i>caudal / foxo</i>	15 (2)	1.0	0.07	<i>foxo</i>	15 (2)	1.6	0.11	< 0.0001
30 c	Mifepriston	20 (2)	1.0	0.10	Kontrolle	16 (2)	1.5	0.19	0.0053
33 e	Mifepriston	16 (2)	1.0	0.08	Kontrolle	15 (2)	1.4	0.12	0.0075
30 d	Mifepriston	16 (2)	1.0	0.15	Kontrolle	16 (2)	1.8	0.30	0.0147

‡ Anzahl der Fliegen (*n*) aus *x* unabhängigen Experimenten

* Mittelwert der relativen Anzahl KFEs und Standardfehler (SEM) des Mittelwertes (Mw)

† Einseitiger Student's t-Test für Stichproben mit ungleicher Varianz

7.5 Tabelle 5 CAFE-Assay

Abb.	t	Stichprobe A	<i>n</i> (x) A ‡	Mw A *	SEM A *	Stichprobe B	<i>n</i> (x) B ‡	Mw B *	SEM B *	<i>p</i> -Wert †
13 d	Tag 1	<i>steppke</i>	7	30.2	6.95	Kontrolle	8	6.3	0.78	0.0029
	Tag 2	<i>steppke</i>	8	29.6	2.40	Kontrolle	8	22.1	1.54	0.0191
	Tag 3	<i>steppke</i>	8	50.9	5.24	Kontrolle	8	19.6	2.15	< 0.0001
	Tag 4	<i>steppke</i>	6	55.5	4.11	Kontrolle	8	31.8	4.41	0.0025
24 c	24 h	<i>caudal / foxo</i>	7	21.1	5.21	<i>foxo</i>	7	18.6	0.12	0.6592
	24 h					<i>caudal</i>	7	18.1	0.12	0.5918
	54 h	<i>caudal / foxo</i>	7	21.9	3.03	<i>foxo</i>	7	18.6	0.12	0.3551
	54 h					<i>caudal</i>	7	17.9	0.12	0.3272
	73 h	<i>caudal / foxo</i>	7	36.7	4.00	<i>foxo</i>	7	42.7	0.12	0.4034
	73 h					<i>caudal</i>	7	23.1	0.12	0.0254
	102 h	<i>caudal / foxo</i>	7	41.9	5.03	<i>foxo</i>	7	42.6	0.12	0.8886
	102 h					<i>caudal</i>	7	27.6	0.12	0.0849
	120 h	<i>caudal / foxo</i>	7	42.1	6.03	<i>foxo</i>	7	35.9	0.12	0.5041
	120 h					<i>caudal</i>	7	31.5	0.12	0.2670
	144 h	<i>caudal / foxo</i>	7	50.7	6.52	<i>foxo</i>	7	46.8	0.12	0.6424
	144 h					<i>caudal</i>	7	55.5	0.12	0.6480

‡ Anzahl der Fliegenpaare (*n*)

* Mittlere Nahrungsaufnahme (nl pro Stunde und Fliege) und Standardfehler (SEM) des Mittelwertes (Mw)

† Zweiseitiger Student's t-Test für Stichproben ungleicher Varianz

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb	Abbildung
B	Basen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälber Serum
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Milli
min	Minute
M	Molar
Mw	Mittelwert
n	Anzahl
p	P-Wert
p. a.	<i>pro analysis</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	Umdrehungen in der Minute
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
t	Zeitpunkt
ÜN	über Nacht
VE	Voll entmineralisiert
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Der Insulinsignalweg	5
Abbildung 2	Domänenstruktur von Steppke	7
Abbildung 3	Drosophila steppke-Mutante	8
Abbildung 4	Schematische Darstellung eines Apatamer-Screens	9
Abbildung 5	Der Cytohesin-Inhibitor SecinH3	9
Abbildung 6	Antimikrobielle Peptide in Drosophila	14
Abbildung 7	Disposable Soma Theory nach Kirkwood	16
Abbildung 8	Transkriptionelle Aktivierung von AMPs durch FOXO.....	19
Abbildung 9	Schematische Darstellung der Drosomycin-Promotor-Konstrukte.....	46
Abbildung 10	Mutation der FOXO- und Forkhead-Binde-Motive	47
Abbildung 11	FOXO-abhängige Transkription von Drosomycin	48
Abbildung 12	Abhängigkeit der Drosomycin-Expression von FOXO/Forkhead-Bindemotiven.....	49
Abbildung 13	Die IIS-Mutante steppke ^{K/SH} hat eine verlängerte Lebensspanne	51
Abbildung 14	Der Steppkeinhibitor SecinH3 verlängert die Lebensspanne von Drosophila	53
Abbildung 15	SecinH3 verstärkt kumulativ die Verlängerung der Lebensspanne in steppke ^{K/SH} - Mutanten	54
Abbildung 16	SecinH3 wirkt konzentrationsabhängig auf die Lebensspanne von Drosophila	55
Abbildung 17	Die Wirkung von SecinH3 auf die Lebensspanne ist spezifisch und unabhängig vom Stamm.	57
Abbildung 18	SecinH3 wirkt FOXO-abhängig auf die Lebensspanne von Drosophila.	58
Abbildung 19	Sieben SecinH3-Alternativen, durch ein Screening in S2-Zellen identifiziert	60
Abbildung 20	Der neue Steppke-Inhibitor Secin16 verlängert die Lebensspanne von Drosophila	61
Abbildung 21	Steppke induziert die Transkription von AMPs im Darm von adulten Drosophila	62
Abbildung 22	steppke ^{K/SH} -Mutanten zeigen eine verbesserte Immunabwehr	63
Abbildung 23	FOXO induziert die Transkription von AMPs im Darm von adulten Drosophila	64
Abbildung 24	Die Expression von foxo im Darm von Drosophila führt zu einer verbesserten Immunabwehr	66
Abbildung 25	Drosocin-Expression mit dem GeneSwitch-System.	67
Abbildung 26	Die Expression von Drosocin verlängert die Lebensspanne von Drosophila	68
Abbildung 27	Die Verlängerung der Lebensspanne durch Drosocin ist Level-abhängig.....	69
Abbildung 28	Die Expression von Cecropin A1 verlängert die Lebensspanne von Drosophila.....	70
Abbildung 29	Das Muster der Genexpression im Mitteldarm von tubulin ^{GS} -Fliegen	72
Abbildung 30	Die Expression von Drosocin oder Cecropin A1 führt zu einer verbesserten Immunabwehr	74
Abbildung 31	Keine Verlängerung der Lebensspanne durch AMP-Expression in keimreduzierter Umgebung.....	76
Abbildung 32	Das Muster und die Level der Genexpression im Mitteldarm von Tigs2 ^{GS} -Fliegen	78
Abbildung 33	Die Expression von Drosocin im Darm verbessert die lokale Immunabwehr und verlängert die Lebensspanne von Drosophila.....	80
Abbildung 34	In keimreduzierter Umgebung verlängert die darmspezifische Expression von Drosocin- Expression die Lebensspanne von Drosophila nicht	81

10 Literaturverzeichnis

Agaisse, H., Petersen, U.M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., Perrimon, N., 2003. Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* 5, 441-450.

Alic, N., Andrews, T.D., Giannakou, M.E., Papatheodorou, I., Slack, C., Hoddinott, M.P., Cocheme, H.M., Schuster, E.F., Thornton, J.M., Partridge, L., 2011. Genome-wide dFOXO targets and topology of the transcriptomic response to stress and insulin signalling. *Mol Syst Biol* 7, 502.

Alper, S., 2010. Model systems to the rescue: The relationship between aging and innate immunity. *Commun Integr Biol* 3, 409-414.

Alper, S., McElwee, M.K., Apfeld, J., Lackford, B., Freedman, J.H., Schwartz, D.A., 2010. The *Caenorhabditis elegans* germ line regulates distinct signaling pathways to control lifespan and innate immunity. *J Biol Chem* 285, 1822-1828.

Arantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., Kenyon, C., 2002. Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 295, 502-505.

Arden, K.C., 2008. FOXO animal models reveal a variety of diverse roles for FOXO transcription factors. *Oncogene* 27, 2345-2350.

Baltzer, S.A., Brown, M.H., 2011. Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol* 20, 228-235.

Barzilai, N., Guarente, L., Kirkwood, T.B., Partridge, L., Rando, T.A., Slagboom, P.E., 2012. The place of genetics in ageing research. *Nat Rev Genet* 13, 589-594.

Becker, T., Loch, G., Beyer, M., Zinke, I., Aschenbrenner, A.C., Carrera, P., Inhester, T., Schultze, J.L., Hoch, M., 2010. FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature* 463, 369-373.

Bill, A., Schmitz, A., Albertoni, B., Song, J.N., Heukamp, L.C., Walrafen, D., Thorwirth, F., Verveer, P.J., Zimmer, S., Meffert, L., Schreiber, A., Chatterjee, S., Thomas, R.K., Ullrich, R.T., Lang, T., Famulok, M., 2011. Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. *Cell* 143, 201-211.

Bohni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andrus, B.F., Beckingham, K., Hafen, E., 1999. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97, 865-875.

Boman, H.G., 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 61-92.

Britton, J.S., Lockwood, W.K., Li, L., Cohen, S.M., Edgar, B.A., 2002. *Drosophila*'s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Dev Cell* 2, 239-249.

Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., Hafen, E., 2001. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11, 213-221.

Brummel, T., Ching, A., Seroude, L., Simon, A.F., Benzer, S., 2004. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12974-12979.

Bulet, P., Stocklin, R., Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198, 169-184.

Chertov, O., Yang, D., Howard, O.M., Oppenheim, J.J., 2000. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev* 177, 68-78.

Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leevers, S.J., Partridge, L., 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292, 104-106.

Colombani, J., Andersen, D.S., Leopold, P., 2012. Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 336, 582-585.

D'Souza-Schorey, C., Chavrier, P., 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 347-358.

De Gregorio, E., Spellman, P.T., Rubin, G.M., Lemaitre, B., 2001. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12590-12595.

De Gregorio, E., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M., Lemaitre, B., 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J* 21, 2568-2579.

Donaldson, J.G., Finazzi, D., Klausner, R.D., 1992. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360, 350-352.

Elliott, D.A., Brand, A.H., 2008. The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes. *Methods Mol Biol* 420, 79-95.

Evans, E.A., Chen, W.C., Tan, M.W., 2008a. The DAF-2 insulin-like signaling pathway independently regulates aging and immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* 7, 879-893.

Evans, E.A., Kawli, T., Tan, M.W., 2008b. *Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog* 4, e1000175.

Famulok, M., Blind, M., Mayer, G., 2001. Intramers as promising new tools in functional proteomics. *Chem Biol* 8, 931-939.

Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 7, 862-874.

Flachsbar, F., Caliebe, A., Kleindorp, R., Blanche, H., von Eller-Eberstein, H., Nikolaus, S., Schreiber, S., Nebel, A., 2009. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2700-2705.

Fontana, L., Partridge, L., Longo, V.D., 2010. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 328, 321-326.

Frankel, S., Rogina, B., 2006. Sir2, caloric restriction and aging. *Pathol Biol (Paris)* 54, 55-57.

- Fuss, B., Becker, T., Zinke, I., Hoch, M., 2006. The cytohesin Steppke is essential for insulin signalling in *Drosophila*. *Nature* 444, 945-948.
- Garsin, D.A., Villanueva, J.M., Begun, J., Kim, D.H., Sifri, C.D., Calderwood, S.B., Ruvkun, G., Ausubel, F.M., 2003. Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science* 300, 1921.
- Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K.S., Kolanus, W., 2000. Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J* 19, 2525-2536.
- Gershman, B., Puig, O., Hang, L., Peitzsch, R.M., Tatar, M., Garofalo, R.S., 2007. High-resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in *Drosophila*: a key role for dFOXO. *Physiol Genomics* 29, 24-34.
- Giannakou, M.E., Partridge, L., 2007. Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan. *Trends Biochem Sci* 32, 180-188.
- Gingras, A.C., Kennedy, S.G., O'Leary, M.A., Sonenberg, N., Hay, N., 1998. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 12, 502-513.
- Gomez, C.R., Nomellini, V., Faunce, D.E., Kovacs, E.J., 2008. Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* 43, 718-728.
- Grewal, S.S., 2009. Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1006-1010.
- Ha, E.M., Oh, C.T., Ryu, J.H., Bae, Y.S., Kang, S.W., Jang, I.H., Brey, P.T., Lee, W.J., 2005. An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Dev Cell* 8, 125-132.
- Hafen, E., 2004. Interplay between growth factor and nutrient signaling: lessons from *Drosophila* TOR. *Curr Top Microbiol Immunol* 279, 153-167.
- Hafner, M., Schmitz, A., Grune, I., Srivatsan, S.G., Paul, B., Kolanus, W., Quast, T., Kremmer, E., Bauer, I., Famulok, M., 2006. Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature* 444, 941-944.
- Hafner, M., Vianini, E., Albertoni, B., Marchetti, L., Grune, I., Gloeckner, C., Famulok, M., 2008. Displacement of protein-bound aptamers with small molecules screened by fluorescence polarization. *Nat Protoc* 3, 579-587.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J.M., 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861.
- Hay, N., Sonenberg, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-1945.
- Hietakangas, V., Cohen, S.M., 2009. Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet* 43, 389-410.

- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G., 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 106, 7-16.
- Hwangbo, D.S., Gershman, B., Tu, M.P., Palmer, M., Tatar, M., 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429, 562-566.
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., Hafen, E., 2002. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr Biol* 12, 1293-1300.
- Ja, W.W., Carvalho, G.B., Mak, E.M., de la Rosa, N.N., Fang, A.Y., Liong, J.C., Brummel, T., Benzer, S., 2007. Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8253-8256.
- Jackson, C.L., Casanova, J.E., 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* 10, 60-67.
- Junger, M.A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J.D., Vegh, M., Radimerski, T., Greenberg, M.E., Hafen, E., 2003. The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J Biol* 2, 20.
- Kang, S.J., Kim, D.H., Mishig-Ochir, T., Lee, B.J., 2012. Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. *Arch Pharm Res* 35, 409-413.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R., 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461-464.
- Kirkwood, T.B., 1977. Evolution of ageing. *Nature* 270, 301-304.
- Kirkwood, T.B., 2005. Understanding the odd science of aging. *Cell* 120, 437-447.
- Kirkwood, T.B., 2008. A systematic look at an old problem. *Nature* 451, 644-647.
- Kirkwood, T.B., Austad, S.N., 2000. Why do we age? *Nature* 408, 233-238.
- Klarlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A., Czech, M.P., 1997. Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* 275, 1927-1930.
- Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., Stehle, T., Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M., Ferrandon, D., Ramet, M., Ezekowitz, R.A., 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123, 335-346.
- Kolanus, W., 2007. Guanine nucleotide exchange factors of the cytohesin family and their roles in signal transduction. *Immunol Rev* 218, 102-113.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H., Seed, B., 1996. Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 86, 233-242.

- Kramer, J.M., Davidge, J.T., Lockyer, J.M., Staveley, B.E., 2003. Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation. *BMC Dev Biol* 3, 5.
- Lai, Y., Gallo, R.L., 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30, 131-141.
- Leevers, S.J., Weinkove, D., MacDougall, L.K., Hafen, E., Waterfield, M.D., 1996. The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *EMBO J* 15, 6584-6594.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25, 697-743.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1995. A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9465-9469.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14614-14619.
- Libert, S., Chao, Y., Zwiener, J., Pletcher, S.D., 2008. Realized immune response is enhanced in long-lived *puc* and *chico* mutants but is unaffected by dietary restriction. *Mol Immunol* 45, 810-817.
- Liehl, P., Blight, M., Vodovar, N., Boccard, F., Lemaitre, B., 2006. Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS Pathog* 2, e56.
- Mayer, G., Blind, M., Nagel, W., Bohm, T., Knorr, T., Jackson, C.L., Kolanus, W., Famulok, M., 2001. Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4961-4965.
- Meister, M., 2004. Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* 16, 10-15.
- Miron, M., Lasko, P., Sonenberg, N., 2003. Signaling from Akt to FRAP/TOR targets both 4E-BP and S6K in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 23, 9117-9126.
- Miron, M., Verdu, J., Lachance, P.E., Birnbaum, M.J., Lasko, P.F., Sonenberg, N., 2001. The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 3, 596-601.
- Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C., 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277-283.
- Orr, W.C., Sohal, R.S., 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263, 1128-1130.

- Osterwalder, T., Yoon, K.S., White, B.H., Keshishian, H., 2001. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12596-12601.
- Paaby, A.B., Schmidt, P.S., 2009. Dissecting the genetics of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)* 3, 29-38.
- Partridge, L., Alic, N., Bjedov, I., Piper, M.D., 2011. Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Exp Gerontol* 46, 376-381.
- Pham, L.N., Dionne, M.S., Shirasu-Hiza, M., Schneider, D.S., 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog* 3, e26.
- Phelps, C.B., Brand, A.H., 1998. Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* 14, 367-379.
- Poirier, L., Shane, A., Zheng, J., Seroude, L., 2008. Characterization of the *Drosophila* gene-switch system in aging studies: a cautionary tale. *Aging Cell* 7, 758-770.
- Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M.L., Tjian, R., 2003. Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev* 17, 2006-2020.
- Puig, O., Tjian, R., 2005. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* 19, 2435-2446.
- Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D., Manfrulli, P., 2002. JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* 241, 145-156.
- Randazzo, P.A., Miura, K., Nie, Z., Orr, A., Theibert, A.B., Kearns, B.G., 2001. Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase regulated Arf signaling. *Trends Biochem Sci* 26, 220-221.
- Ren, C., Webster, P., Finkel, S.E., Tower, J., 2007. Increased internal and external bacterial load during *Drosophila* aging without life-span trade-off. *Cell Metab* 6, 144-152.
- Renault, L., Guibert, B., Cherfils, J., 2003. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* 426, 525-530.
- Ritsick, D.R., Edens, W.A., McCoy, J.W., Lambeth, J.D., 2004. The use of model systems to study biological functions of Nox/Duox enzymes. *Biochem Soc Symp*, 85-96.
- Roman, G., Endo, K., Zong, L., Davis, R.L., 2001. P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12602-12607.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., Brehelin, M., 1996. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* 112 (Pt 1), 135-142.
- Ryu, J.H., Kim, S.H., Lee, H.Y., Bai, J.Y., Nam, Y.D., Bae, J.W., Lee, D.G., Shin, S.C., Ha, E.M., Lee, W.J., 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science* 319, 777-782.

Ryu, J.H., Nam, K.B., Oh, C.T., Nam, H.J., Kim, S.H., Yoon, J.H., Seong, J.K., Yoo, M.A., Jang, I.H., Brey, P.T., Lee, W.J., 2004. The homeobox gene *Caudal* regulates constitutive local expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* epithelia. *Mol Cell Biol* 24, 172-185.

Salih, D.A., Brunet, A., 2008. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* 20, 126-136.

Sansoni, P., Vescovini, R., Fagnoni, F., Biasini, C., Zanni, F., Zanlari, L., Telera, A., Lucchini, G., Passeri, G., Monti, D., Franceschi, C., Passeri, M., 2008. The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol* 43, 61-65.

Schonwetter, B.S., Stolzenberg, E.D., Zasloff, M.A., 1995. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267, 1645-1648.

Selman, C., Lingard, S., Choudhury, A.I., Batterham, R.L., Claret, M., Clements, M., Ramadani, F., Okkenhaug, K., Schuster, E., Blanc, E., Piper, M.D., Al-Qassab, H., Speakman, J.R., Carmignac, D., Robinson, I.C., Thornton, J.M., Gems, D., Partridge, L., Withers, D.J., 2008. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J* 22, 807-818.

Slack, C., Giannakou, M.E., Foley, A., Goss, M., Partridge, L., 2011. dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in *Drosophila*. *Aging Cell* 10, 735-748.

Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H.G., 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-248.

Strauss, E., 2001. Longevity. Growing old together. *Science* 292, 41-43.

Stumpfe, D., Bill, A., Novak, N., Loch, G., Blockus, H., Geppert, H., Becker, T., Schmitz, A., Hoch, M., Kolanus, W., Famulok, M., Bajorath, J., 2010. Targeting multifunctional proteins by virtual screening: structurally diverse cytohesin inhibitors with differentiated biological functions. *ACS Chem Biol* 5, 839-849.

Taguchi, A., Wartschow, L.M., White, M.F., 2007. Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 317, 369-372.

Taguchi, A., White, M.F., 2008. Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu Rev Physiol* 70, 191-212.

Taha, C., Klip, A., 1999. The insulin signaling pathway. *J Membr Biol* 169, 1-12.

Tatar, M., Khazaeli, A.A., Curtsinger, J.W., 1997. Chaperoning extended life. *Nature* 390, 30.

Teleman, A.A., 2009. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem J* 425, 13-26.

Teleman, A.A., 2010. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem J* 425, 13-26.

Teleman, A.A., Chen, Y.W., Cohen, S.M., 2005. 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev* 19, 1844-1848.

- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13, 737-748.
- Tzou, P., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., 2002. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2152-2157.
- Uvell, H., Engstrom, Y., 2007. A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet* 23, 342-349.
- Van Der Heide, L.P., Hoekman, M.F., Smidt, M.P., 2004. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380, 297-309.
- Vihervaara, T., Puig, O., 2008. dFOXO regulates transcription of a *Drosophila* acid lipase. *J Mol Biol* 376, 1215-1223.
- Vijg, J., Campisi, J., 2008. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* 454, 1065-1071.
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F., Lemaitre, B., 2005. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11414-11419.
- Wang, H.D., Kazemi-Esfarjani, P., Benzer, S., 2004. Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12610-12615.
- Willcox, B.J., Donlon, T.A., He, Q., Chen, R., Grove, J.S., Yano, K., Masaki, K.H., Willcox, D.C., Rodriguez, B., Curb, J.D., 2008. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13987-13992.
- Williams, M.J., 2007. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol* 178, 4711-4716.
- Xavier, R.J., Podolsky, D.K., 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434.
- Xuan, Z., Zhang, M.Q., 2005. From worm to human: bioinformatics approaches to identify FOXO target genes. *Mech Ageing Dev* 126, 209-215.
- Yang, D., Chen, Q., Chertov, O., Oppenheim, J.J., 2000. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 68, 9-14.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

11 Anhang

11.1.1 Genomische DNA-Sequenz des Drosomycin-Lokus

CCATCAGCTTCTCCCGTGTTTCAGCGGAGAGTTCCAGCGAAAGCGAGGCCAGTCGATATCATCCGTGTCCGGAG
TGAAGGGCAGCAAGGGAACCAAGGAGGAGCGCCGAGCGGCATGTTCCGAATCTTCGGCCGCAAGGGCGACAAGG
AGAAGGAAAAGGACAAGGACAAGCGCCGCTCGAGTCAAGTCCCGCCACAGTGAGAACATATATAAAATTCGGATA
ATGAGAAGGAGCGCCACCGTTACAACAGATGAACCAGGCCGAATTGTTTTTTGTATTTTTTATAAACACCATGAT
TATGTCATTTGTATTTCGCCAAGGGCAATCAAATTTAAAAACAAAACCAACTACTAAACGAGACAAGATATGAAAA
AGTTGAAACATTAACGTGTGCGATTTAAAGCTAAAGCGGCAAATGAAAGTATAAAAGAAAATATTATATATATATAA
AGTCAATGTGTTAATTGCATTATAAAATGTATCTGTAAGTTTGTTGCGTTGTATGATTAAATTTAATATTCGTAAA
ACAAAATACTTAAACAATAAATACCATACATTGTGAAATCAAACCTCAGCTTAATGTTAATTCTAACCTTGTGGGA
GATTTAGGACAATTCTGCAAGTAAGCTTATACGATGGGATGGTAATACAAGTTGGTTATATATTATATTATATTA
TACACTTTCTACCTAAGGCAATCTTAGCAACAACGATAGATAATATTATAGGAACATATGATGATATAGAAAAGA
AAATAAGAAAATCAGCTTAGTATTTTTTATTTAAACAAAACACTAAAATAAAAACTTCAAAAATTATGTAGCTGAT
TTTTGTTATAATCGCACGAAGCCCAAAAGAATGCTGCAAAAATGAACAAGGGAAAATGTAGCTATTAAAAAGCGCA
GCATGTAGAAATCTTGATTTTATACAGTTGCTTTAAATAATCATCAATGCTTATCTAATATTTTGCAAAAAGTAAA
TTTTATATTGTTTCATAGAAATTCAACAATATAAAAGTAAACAAAACGCTATTAGGCCGGATGTTTATATTTTCA
CGACGAACCTTCAATAACATAATATTTGATCTTCATTGAGTAACGCATTAATCAAATTTTTTACTTTTTTCGGTCGT
TTCGAATTTTGTTTACCGTTTTTATCAGTCTATTATTATGATGGGCTAGATGTTGTTTATAGATGTTTATTTAAG
AACATTATCAATACAAAAACATCAATGAAAGTGATAATACGAATTGACCATGTAGCAATTTGTTTTGTGCTCTATA
GACTGAATTTTTTCCCTACATTAATCAAAATTATATTTTTATATTTTATTTTGTAGTTTACTTGGGTTTTTCATG
AAATTAAGATTAACCTGGGGTTTTTACAATCCATTACGATAGGCTTTCTGTTTATTGCATCTATAGCCTCTGTA
CTTTTCCGTGCATTCTTAAAGCAAAAGCATACATGTATATCTTCAATTCAAGTATATCTGCAATTTAGTTTGCTT
ATCTGGAGTCGCTGTATCCCGACCTATCCAACTCGCGTCCCGAGTCAAAGGTAAACCATTTTTATTTAGTTCCCA
GCCTCTGGTATTTGTTGTTATTTATCGGTGACTTTTTGAAATTTATTCAATTAATTTTCAGTCTTTGTGCTCTTGA
TAACACGATTTCTCGTTATTCATTTAGTTTGGGTTTAAACAAAACCTTTAGCGAATCATTTTTGCTGGACAGT
CCAGTTGAATTCGGTATTCTACACACAAAGCTCATCTTACAGTGAAAAGTGTTACTTTATGAAATACAAATGAGG
CTCTAAGCAATGCTTTTCGCTTACGCTTTTCGATAAGCGTACAAGTAGTTCCCTACCGAAGGCCATATAAATGTG
ACTGCACATGTATCATCATAATTTGTTGATATACTTCGTTTATACCGACTACGCATCGGCTAAAGCTGAGGGAT
CGGTGCATATATAAGCTTCTCCTCGAAGTTCCCAAGCCACAAGTCGCTGATAATTCAAACAGAAATCATTTACC
AAGCTCCGTGAGAACCTTTTCCAATATGATGCAGATCAAGTACTTGTTTCGCCCTCTTCGCTGCTCGTATGCTGGT
GGTCTGGGAGCCACGAGGCCGATGGCGACTGCCTGTCCGGAAGATACAAGGGTCCCTGTGGGCTCTGGGACAA
CGAGACCTGTGCTGCTGTGTGCAAGGAGGAGGGACGCTCCAGTGGCCACTGCAGCCCCAGTCTGAAGTGCTGGTG
CGAAGGATGCTAAATCCATGAGCAATTAGCATGAACGTTCTGAAAAGCGCGTTTAGCTCTCCACTACTTACACAT
ATTCTATGCTGCAATATTGAAAATCTAATAAAACAAAATAATGTACATTAATTCCTTCAGTTTTTGAATATCCTTCT
CCTGACTTTCTTATTTAGAATTAATATAATACTGCATACATTAATACTGTAAATATGATAAGTACCTGCAAAAACA
CTGCAGCTCAAGTCTTAATGAGGTTCTGCGATAGCTTAGCATAATTAGTAACCTTATCGCGCAGGAATTCCCTAAT
GTTCCCGACCTACATGTACTTCTGATAGTTGCCGAGGTCAAATGTTGTTGTATTGTATTATACCTCAATATTGG
TATATTCAATATCTAATAGTACCCAATTCAATTGCAAAGATAGTCATTAAAAAACCTAAATCACTTGCAAATTG
ACTTTTCTGCCGAAAAGCAACCTTGACACACAAAGTTAATTAGTTTATCTGGAAGTCATGTGAGAAATTTGTAA
ATAAATAAATAGAAAATTTTTTCGAGTAATTTAAGTGGGCCTAATCCCTTTTAAGCATCTTGGTTTTACGATGAC
ACCGCAATAAGGTACAACCTTTATATTGTTTTTGCAATCAGCTTGAGTCTTTATTAGGCATCAGTCTTTCTCTCTA
AGTTTCTTCGTGCAATAAATGAGGTTCCAAACTCCGTAGATTTTTCTTTCTTTGTTGAATCCAGATCCTGCAAAG
AAAAAAGAGCAAACCCCTAGGTCTGTCCAGGAATGTATTTTCGTGTTTGTGCGACGGTCTGAGCTTTGGTGAAGCG
TGAAAATGTGGCAGTCACTGAGTGGAATCGATGGGGGGATTGACGCGTGCCCAACTGGTGGGCCAAACACTTCGG
ATTGCTACGGTTTCGTATTGCTATTGAGCCAAAGGGACCCGGAGCGCATCACTCCGGTCCAAAATGTAGGCGGATG
TGTGTCGTGTTTCGGGGAAAGATGGTCTTCTGTGCGCAAGACATATACATAGGTGTTAAATATGATTGCATTAGTT
TTATACTACGTATAAGGAAGCTTTGATTGGATCGAAGCGACTGAAGGCGACCCTCGTCTTGAAATTCGGTAGCA
GTGATTATAACTATAGACCCCCAATTTGGAGCTAGGCTCCGCTCAGGTCTTTGAAAGTCTTTGGGGGGCAGTGGCC
CCTTTGATTTTTCGGTTTTGCTTTTGCTAAGTCCAACCTCTCGTTTTTGGAACTTTTGGGGTGGTGGATGGAGAAGGG
GGCTTTGTGGGGTTTTGGCACACACGATACACACATCACTGATTGATCACTGCTCATGTTAACTTAAGTTCGTTCA
TGGTGTGTTGTTGGTTGTGGTTGTGTTGTTGGGCGTCTCTTTAAAGTCTCTTTCTCTCGCTTTCTCTCGCTAC
TTTTCGCTTTGGGAGGTAAATAAAGTTCACATTTTCTCTCTTTTCAATTTTGTATTTTTGTGGTTTAAAAATATTTAA
TTAGCATTAAGATCTCTGCTGTATTGAAATTTGCTTAAGTCGTAAGTTTGTTTTTAATCTTAGTGTTGGTGGTGG
GGGTGTTTGGTGAGCGGGACAGAGAGAAAGGGGAAAGAGAGTTGTATCGACTTTAGACGATAGCCGGTTTTATCA
TATTAACTTTTTGCTTATACCGTAACGCATTCAATATTTCTCTTTAGATTTTACACGCGAGAGGATTAGGATTA

CACTTTCCGATTCTAGCGAGGCCAGGAGCACGATCTCGTTTTTAAACCTCGATGCGGCCTAGCGCCTGTTGTCCCG
ATAGCTTCGCTGGCCGCCGCCGCCGCGCCACGCTCGCGAAACGGTCGCGAATCCCGCGAAGATCCGCCGCCACCGCT
GCGATTTCCGTACTCCCGTCGACGACCGCCCGCGGAGCCGTTGTTGCCGTCCCGATTCCGATAGCCGCCGGGTCC
ACCCATACCGCCACCGGATCCTCCACCGGCTCCCATGCCACCGCCCGCAGCCGCCCGCTGGGCAGCAGCTAACCC
GCCAGCTCCATTGCTACCGCCATTGGCTGCTCCGCCGTAGACGGGGAAGCCAGGCGGTGGCACTGTGGGTAGGCC
AGCATTCTTCCAGGCAGCAAACCTCCT

FOXO-Bindemotiv , Forkhead-Bindemotiv , Drosomycin-Transkript

12 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Hoch für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe an einem so spannenden Thema durchführen zu können. Ich weiß besonders sein ständiges Vertrauen und seine Unterstützung in den schwierigeren Zeiten sehr zu schätzen.

Privatdozent Dr. Reinhard Bauer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Hoch, die mich in den letzten Jahren begleitet haben. Ich habe die außergewöhnlich gute Atmosphäre im Labor immer sehr zu schätzen gewusst. Eine große Hilfe waren mir bei meiner Arbeit meine Dokortante Pilar und mein Doktoronkel Ingo. Sie sind die besten Projektkollegen, die man sich nur wünschen kann. Ich danke Ingo besonders für seine Geduld und seine stets positive Einstellung.

Für ihre Hilfe bei der Gestaltung dieser Arbeit, für Ratschläge und Korrekturen möchte ich mich bei Ingo, meiner Freundin Hanna und meinem Vater bedanken.

Bei allen meinen Freunden, vor allem Jan und Riga, bedanke ich mich für die großartige Freizeitgestaltung. Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung. Hanna, Danke für Deine Geduld und Dein MacBook, vor allem aber für die schöne Zeit.